

**Quantitative Untersuchung der Veränderungen
in der Sekundär- und Tertiärstruktur
von Homopolypeptiden und globulären Proteinen
bei Elektronenbeschuß (100 keV Elektronen)
mit Hilfe rechnerunterstützter
ATR-Infrarotspektroskopie**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

**zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf**

vorgelegt von

**Jan Seredynski
aus Alt-Sandetz**

**Düsseldorf
1979**

Quantitative Untersuchung der Veränderungen
in der Sekundär- und Tertiärstruktur
von Homopolypeptiden und globulären Proteinen
bei Elektronenbeschuß (100 keV Elektronen)
mit Hilfe rechnerunterstützter
ATR-Infrarotspektroskopie

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jan Seredynski

aus Alt-Sandetz

Düsseldorf

1979

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Vogell

2. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Birkofer

Tag der mündlichen Prüfung: 2 Nov. 1979



Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	1
B. Materialien und Methoden	7
ATR-Infrarotspektroskopie	7
Präparation der Proteinschichten	8
Präparation der Homopolypeptidmonolayer	9
Bestimmung der Dicke der Proteinschichten	10
Wasserstoff-Deuterium-Austausch	12
Numerische Auswertung der Spektren	14
Bandenformanalyse	15
Bestrahlungen	16
C. Dosimetrie	18
D. Experimenteller Teil	25
Überblick über die IR-Spektroskopie der Poly- peptide und Proteine	25
Massenverlust	28
CH ₂ - und CH ₃ -Banden	28
COO ⁻ -Bande	36
Amid I-, Amid II-Bande	37
Bestrahlungen von Homopolypeptiden	41

Bandenformanalyse bestrahlter Homopolypeptide	46
Strahlenschutzwirkung durch aromatische Gruppen	50
Bestrahlungen von globulären Proteinen	53
Charakterisierung der verwendeten Proteine	53
Bandenformanalyse der Amid I- und Amid II-Banden	55
β -Struktur-Bande (Amid I-Region)	63
α -Helix/Random coil- und nicht wasserstoff- gebundene C=O-Bande (Amid I)	66
α -Helix-Bande (Amid II)	66
Diskussion	70
Wasserstoff-Deuterium-Austausch bestrahlter Proteine	74
E. Zusammenfassung	85
Literaturverzeichnis	88

A. Einleitung

Die technische Entwicklung der Elektronenmikroskopie hat im Laufe der letzten Jahre einen Stand erreicht, der es erlaubt, einzelne Schweratome abzubilden (4, 15, 13, 31, 32). Dennoch wird es für den Elektronenmikroskopiker vorerst unerreichbar bleiben, diese Grenzauflösung von weniger als 0,3 nm für die direkte Abbildung biologisch relevanter Strukturen, die aus Leichtatomen zusammengesetzt sind, einzusetzen. Die Diskrepanz zwischen der technisch möglichen Auflösung und der praktisch erreichbaren von 1.5 - 3 nm ist hauptsächlich durch Strahlenschäden, die die zur Abbildung benutzten Elektronen verursachen, bedingt. Als Beispiel dafür, welcher Strahlenbelastung das Objekt im Elektronenmikroskop ausgesetzt ist, sei angeführt, daß z.B. zur Abbildung eines Schweratoms in einem Monolayer aus Kohlenwasserstoffen mit ausreichendem Signal/Rausch-Verhältnis mindestens $2 \cdot 10^3 \text{ e}^-/\text{nm}^2 = 1.25 \cdot 10^{10} \text{ rad}$ notwendig sind (6); etwa $1.6 \text{ e}^-/\text{nm}^2 = 1 \cdot 10^7 \text{ rad}$ genügen aber bereits, um die meisten Enzyme zu inaktivieren (9).

Kurz dargestellt bietet sich folgender Sachverhalt für die Wechselwirkung Elektron - Objekt:

Schnelle Elektronen, wie sie in der Elektronenmikroskopie angewandt werden, erleiden beim Durchdringen eines dünnen Objekts entweder keine Wechselwirkung oder sie werden

elastisch oder unelastisch an den Atomen, aus denen sich das Objekt aufbaut, gestreut.

Der Fall, in dem keine Wechselwirkung eintritt, kann offensichtlich außer acht gelassen werden. Auch die elastisch gestreuten Elektronen, die die meiste Information über das Objekt liefern, tragen kaum zum Strahlenschaden bei. Die Impuls- und Energieübertragung vom Elektron zum streuenden Atom sind beim elastischen Streuprozess vernachlässigbar klein. Nur in Fällen großer Streuwinkel, wobei einige eV an Energie übertragen werden, und bei direktem Auftreffen des Elektrons auf den Atomkern ("knock-on-collisions") können Atome delokalisiert werden. Für den letzteren Fall ist der Streuquerschnitt allerdings vernachlässigbar klein.

Den überwiegenden Teil der Strahlenschäden verursachen die unelastisch gestreuten Elektronen, die zudem nur sehr wenig zum Bildkontrast beitragen. Das Verhältnis des gesamten unelastischen zum elastischen Streuquerschnitt beträgt nun $\sigma_{in}/\sigma_{el} \approx 20/Z$ (Z : Ordnungszahl) (45). Für Biomoleküle ($Z \approx 6$) erhalten wir somit das sehr ungünstige Verhältnis von ≈ 3 (9).

Energieverlustspektren gestreuter Elektronen ergaben, daß in biologischen Objekten Elektronenanregung und Erzeugung von Plasmonen (kollektive Anregung) den überwiegenden Teil des Energieverlustes unelastisch gestreuter

Elektronen bedingen (26, 35). Der Strahlenschaden wird dann verursacht durch sekundäre Prozesse wie Aufbrechen von chemischen Bindungen, Erzeugung von hochreaktiven Radikalen mit nachfolgender intermolekularer Vernetzung. Ferner werden Fragmentierung, Ortswechsel und Verdampfung molekularer Fragmente beobachtet (25, 27, 56).

Abgesehen von den bisher noch nicht sehr effizienten Verfahren, die die Resistenz des Objektes selbst gegen Strahlenschäden erhöhen (z.B. Objektkühlung, 'Sustains'), bleibt dem Elektronenmikroskopiker nur die Möglichkeit, Methoden anzuwenden, die es ihm erlauben, mit submarginalen Strahlendosen zu arbeiten, und die Strukturinformation über das Objekt durch nachträgliche analog-optische oder digitale Bildverarbeitungstechniken herauszuarbeiten (21, 39, 40, 41, 50, 59, 64). Er nutzt dabei die in den Bildern enthaltene Redundanz aus: Es wird ein Bild, das viele gleichartige Strukturelemente enthält, mit minimaler Dosis aufgenommen. Jedes Strukturelement enthält nur einen Teil unzerstörter Information; durch Überlagerung dieser einzelnen Elemente, d.h. Addition der Information im Fourier- oder Ortsraum, erhält man gemittelte Aussagen über das (unzerstörte) Objekt. Die Anwendung dieser Verfahren setzt voraus, daß die strahlenbedingten Veränderungen am Objekt rein stochastischer Natur sind und sich somit herausmitteln oder besser ausgedrückt, nur einen gleichmäßigen, strukturlosen Untergrund nach der Verarbeitung der Bilder ergeben.

Für den Anwender der oben erwähnten Bildverarbeitungsverfahren ist es somit von grundlegendem Interesse zu wissen, welche Zerstörungen die ihn interessierende Struktur bei einer gegebenen Strahlendosis erlitten hat und darüberhinaus, ob die bei dieser Dosis entstandenen Veränderungen rein stochastischer Natur sind oder ob sich Trends zu bestimmten Strukturen abzeichnen. Im letzteren Fall liefert die Bildverarbeitung falsche Aussagen, die bei Unkenntnis der Sachlage zu Fehlinterpretationen der Bilder verleiten können.

Seit der Frühzeit der Elektronenmikroskopie war man sich des Problems der Strahlenschädigung der Objekte bewußt, und es wurde eine Reihe von Methoden zu deren Charakterisierung und Quantifizierung entwickelt. Kurz erwähnt seien hier ohne den Anspruch auf Vollständigkeit:

- a) Messung der Abnahme der Intensität von Beugungsfiguren kristalliner Objekte (8, 24)
- b) direkte Beobachtung der Ortsveränderung von Schweratomen anhand von hintereinander aufgenommenen Bildern schweratomhaltiger Präparate (29, 33, 43)
- c) Korrelations- und Differenzbildmethoden, die unter Zuhilfenahme analog-optischer oder digitaler Bildverarbeitungsanlagen durchgeführt werden (20)
- d) Massenverlustmessung:
 - 1) autoradiographisch (63)
 - 2) im Durchstrahlungsrasterelektronenmikroskop (17)

3) gravimetrisch (3)

- e) infrarotspektroskopische Methoden (27, 52, 61)
- f) Messung der Abnahme der biologischen Aktivität (2, 28)
- g) Messung der Veränderung des isoelektrischen Punktes (9)

Wir haben uns bereits mit den unter f) und g) erwähnten Methoden, die mehr globale Aussagen über das Verhalten des untersuchten Objekts machen, befaßt. Bei der Untersuchung der Strahlenschäden an Lipiden (5) wurden von uns infrarotspektroskopische Verfahren angewandt.

Die IR-Spektroskopie bietet bei der Untersuchung von Strahlenschäden an elektronenmikroskopischen Objekten eine Reihe von Vorteilen:

- 1) Präparate brauchen nicht in Lösung gebracht werden für die Analyse.
- 2) Es steht eine echte Kontrolle zur Verfügung, d.h. Messung an unbestrahltem Präparat.
- 3) Bei Anwendung der FMIR-ATR-Technik kann mit Schichten von monomolekularer Dicke gearbeitet werden, vergleichbar der Präparatsituation im Elektronenmikroskop.
- 4) Das Infrarotspektrum enthält einen sehr hohen Informationsgehalt über das untersuchte Molekül. Es können sowohl Schlüsse über das Verhalten einzelner Bindungen als auch über Konformationsänderungen gezogen werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an Lipiden (5) ermutigten uns, zu versuchen, Strahlenschäden an den weit- aus komplizierter aufgebauten Proteinmolekülen IR-spektroskopisch zu charakterisieren und wenn möglich, zu quantifizieren.

Wir hatten uns dabei zum Ziel gesetzt, möglichst umfassende Information über Art und Ausmaß der Strukturveränderung von Proteinen über einen weiten Strahlendosisbereich zu gewinnen. Die für den Elektronenmikroskopiker vordringlichen Fragen über Strahlenempfindlichkeit bestimmter Strukturen und über eventuell vorhandene Trends bei der Strahlenschädigung sollten geklärt werden.

Ferner wollten wir Faktoren untersuchen, die die Empfindlichkeit der Strukturen beeinflussen und im Zusammenhang damit gewisse Einblicke in den Mechanismus der durch Strahlung eintretenden Schädigung gewinnen. Methoden zum Testen von möglichen Strahlenschutzmechanismen sollten etabliert werden.

B. Materialien und Methoden

ATR-Infrarotspektroskopie

Die ATR-Technik erlaubt es, Infrarotspektren sehr dünner Schichten aufzunehmen. Sie bietet uns somit die Möglichkeit, Untersuchungen an Proben durchzuführen, deren Dicke der von elektronenmikroskopischen Präparaten gleichkommt.

Das ATR-(attenuated total reflection)Verfahren beruht auf der vielfachen Totalreflexion des Meßstrahls innerhalb einer planparallelen, infrarotdurchlässigen Platte aus einkristallinem Material mit hohem Brechungsindex, auf der ein- oder auch beidseitig das zu untersuchende Material, das einen wesentlich geringeren Brechungsindex besitzt, aufgebracht ist (Abb. 1). Die Anzahl der internen Reflexionen beträgt je nach Dicke der verwendeten ATR-Platten und in Abhängigkeit von der Strahlgeometrie (18) im Probenraum etwa 40 bis 70. Trotz der Totalreflexion dringt der Meßstrahl für eine kurze Distanz (etwa eine Wellenlänge) aus der Platte in die Probe ein und wird in den Absorptionsbereichen des zu untersuchenden Materials abgeschwächt. Eine detaillierte Beschreibung der ATR-Technik findet man in (18,30, 38).

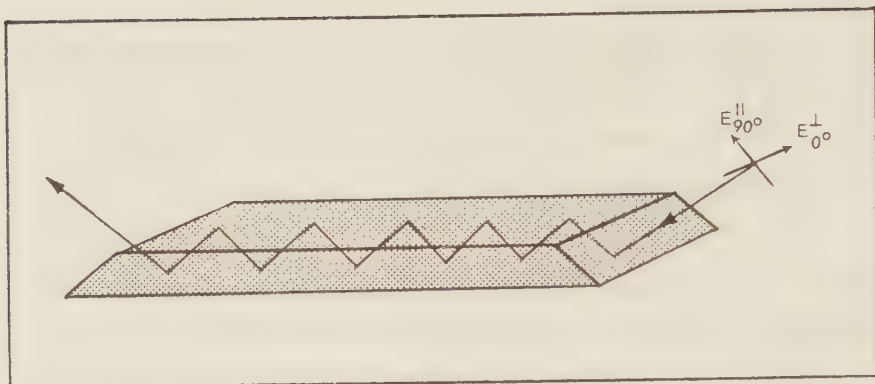


Abb. 1 Schematische Darstellung des Strahlengangs in der ATR-Platte.

$E_{90^\circ}^{\parallel}$, $E_{0^\circ}^{\perp}$: parallel bzw. senkrecht polarisierte Komponenten des elektrischen Feldes des einfallenden Lichts

Die ATR-IR-Spektren wurden mit dem Perkin-Elmer IR-Spektrophotometer 325 aufgenommen. Bei dem verwendeten Gerät handelt es sich um ein hochauflösendes Zweistrahl-Gittergerät mit einem Prismenvormonochromator. Die spektrale Spaltbreite betrug bei der Aufzeichnung der Proteinspektren 1.13 cm^{-1} im Bereich um 1600 cm^{-1} (Amid I-Region).

Präparation der Proteinschichten

Von den zu untersuchenden Proteinen wurden jeweils 2 mg in 1 ml Aqua dest. aufgelöst und davon 50 μl auf Germanium-

ATR-Platten aufgebracht. Die ATR-Platten (50 x 20 x 1 mm) von der Fa. Harrick Sci. Corp. (Ossinig, N.Y.) wurden zuvor mit einer Schleifpaste poliert, gereinigt und in einem Gasplasma hydrophil gemacht. Die aufgebrachte Lösung wurde während des Trocknens mit einem Glasstab ausgestrichen, wodurch eine gleichmäßig dicke Schicht erzielt wurde. Die verwendeten Proteine waren:

Concanavalin-A, Lysozym, Chymotrypsin: Boehringer, Mannheim

β -Lactoglobulin: K & K Laboratories, Plainview, N.Y. (USA)

Haemoglobin: Fluka AG (Schweiz)

Myoglobin: Serva, Heidelberg

Trypsin-Inhibitor: Bayer AG, Werk Elberfeld

Präparation der Homopolypeptidmonolayer

Die zum Spreiten an Luft-Wasser-Grenzfläche benötigten Lösungen wurden aus 10 mg Polymer, die in 10 ml eines geeigneten Lösungsmittels gelöst wurden, hergestellt. Um α -helikale Konformation zu erhalten, wurden PMG₃₂₄ (Poly- γ -methyl-L-glutamat; 324: Anzahl der Monomere im Polymer) und PBG₃₂₀ (Poly- γ -benzyl-L-glutamat) in Chloroform gelöst; ein hoher Anteil an β -Struktur wurde erzielt, indem PMG₁₀₃₀ in einer Lösung aus 1 : 10 Volumenanteilen Chloroform/Pyridin gelöst wurde (47). Alle Lösungsmittel waren von einem Reinheitsgrad pro analysis

und wurden ohne weitere Reinigungsverfahren verwendet. Die angesetzten Lösungen wurden bis zum Gebrauch im Dunkeln aufbewahrt.

Die Monolayer wurden gespreitet, indem mit einer Injektionsspritze kleine Tropfen der zu spreitenden Substanz, die sich an der Spitze der Nadel bildeten, vorsichtig auf die Wasseroberfläche einer Filmwaage vom Langmuir-Typ gebracht wurden (Einzelheiten siehe (6)). Die Monolayer wurden kontinuierlich bis knapp unter den Kollapspunkt komprimiert und im Langmuir-Blodgett-Verfahren (12), bei dem ein motorgetriebener Eintauchmechanismus verwendet wird, auf die ATR-Platten aufgebracht. Die Filmwaage war mit einem Servomechanismus mit Kontrolleigenschaften ausgestattet, die es erlaubten, jeden vorgegebenen Filmdruck während der Übertragung des Monolayers auf das Substrat mit einer Genauigkeit von $0.1 \text{ dyn} \cdot \text{cm}^{-1}$ konstant zu halten.

Die verwendeten Homopolypeptide waren:

Poly- γ -methyl-L-glutamat und

Poly- γ -benzyl-L-glutamat (Sigma, St. Louis, Mo., USA).

Bestimmung der Dicke der Proteinschichten

Die Schichtdicke des aufgetragenen Materials läßt sich am allereinfachsten aus dem spezifischen Gewicht bestimmen

und ergibt sich für ein spezifisches Gewicht der Proteine von etwa 1.4 g/cm^3 , bei einer Fläche der ATR-Platten von 10 cm^2 und bei $100 \text{ } \mu\text{g}$ Auftrag zu $D \sim 71.3 \text{ nm}$.

Um die Homogenität der Schicht zu überprüfen, wurde die Schichtdicke zusätzlich interferometrisch mit einem Lichtmikroskop (Leitz, Orthoplan) und einem Interferometerzusatz nach Michelson (Leitz) vermessen. Da bei den vorliegenden Schichtdicken eine unmittelbare Ablesung im Mikroskop nicht möglich war, wurde das Interferenzstreifensystem fotografisch aufgezeichnet und mit einem Mikrodensitometer (Joyce MK III C) ausgewertet.

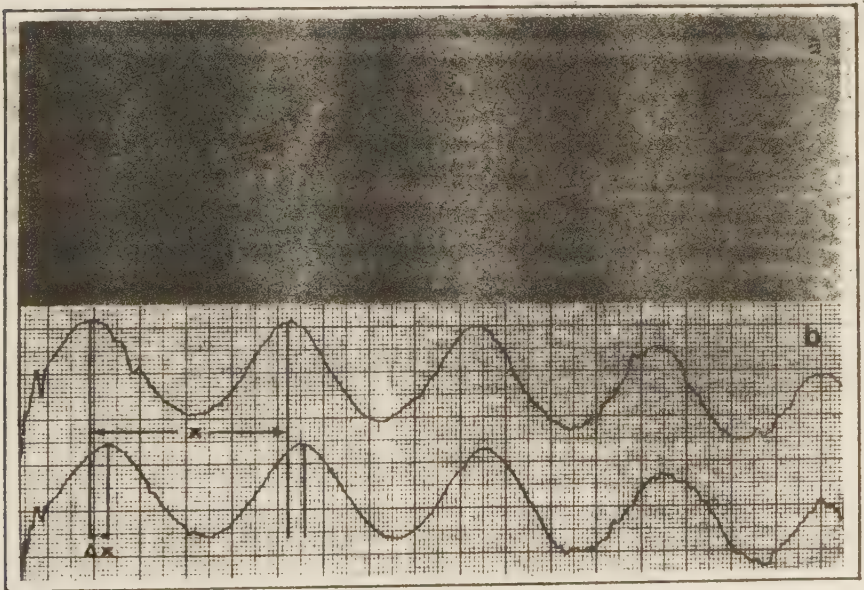


Abb. 2 Interferometrische Bestimmung der Schichtdicke der aufgetragenen Proteine (Erläuterung im Text)

Die Dicke d ergab sich schließlich zu (siehe Abb.2)

$$d = \frac{\lambda/2 \cdot \Delta x}{x}$$

λ : Verwendete Lichtwellenlänge

(in unserem Fall $\lambda = 525 \text{ nm}$)

x : Abstand zweier Interferenzmaxima oder -minima

Δx : Verschiebung der Interferenzstreifen des Substrats und des aufgetragenen Materials gegeneinander.

Der Mittelwert aus acht Messungen ergab eine Dicke von $\sim 73 \text{ nm}$, wobei die maximale Abweichung weniger als 20 % betrug.

Wasserstoff-Deuterium-Austausch

Der Wasserstoff-Deuterium-Austausch wurde vor der Aufnahme des Infrarotspektrums in der in Abb.3 im Querschnitt dargestellten Halterung im IR-Spektrographen durchgeführt. Es wurde dabei getrockneter Stickstoff mit einem Druck von 0.3 Bar durch D_2O geleitet, anschließend das Gemisch an der Probe vorbeigeführt. Der Deuterierungsgrad wurde durch die Dauer der Zufuhr des $N_2 + D_2O$ -Gemisches bestimmt. Da die Geschwindigkeit des Wasserstoff-Deuterium-Austauschs stark von der Temperatur abhängt, wurde die Halterung mit einem Thermostaten auf einer konstanten Temperatur von 25°C gehalten.

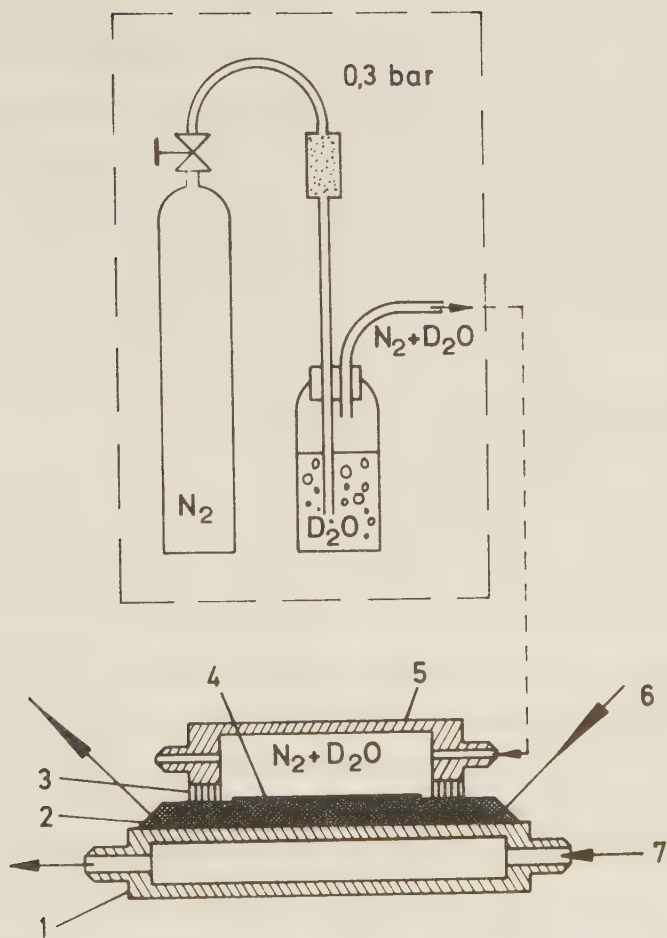


Abb. 3 Schematische Darstellung des Vorgangs des Wasserstoff-Deuterium-Austauschs und der verwendeten ATR-Plattenhalterung (Erläuterungen siehe Text)

1) Thermostatisierte Halterung. 2) ATR-Platte. 3) Indium-Dichtung. 4) Probe. 5) Vorderteil der Halterung mit Gasdurchführungen. 6) Weg des IR-Strahls. 7) Durchströmungsrichtung des thermostatisierenden Mediums.

Vor der Durchführung der Bestrahlungsversuche hatten wir uns davon überzeugt, daß der Vorgang des Wasserstoff-Deuterium-Austauschs vollständig reversibel ist, indem wir deuterierte Proben in mit H_2O gesättigter Atmosphäre rehydriert haben. Das ATR-IR-Spektrum der rehydrierten Proben ist in der Tat identisch mit dem Spektrum der Probe vor der Deuterierung.

Numerische Auswertung der Spektren

Das IR-Spektrophotometer ist mit der Digitalisierungseinheit DDR I C der Fa. Perkin-Elmer ausgestattet, die es ermöglicht, die Spektren für eine Weiterverarbeitung auf einer Großrechenanlage auf Lochstreifen aufzuzeichnen. Die Übertragung und Auswertung der Daten wurde im Rechenzentrum der UNI Düsseldorf auf Anlagen Siemens 4004 und CGK TR 445 durchgeführt. Die hauptsächlichsten Probleme der Datenverarbeitung waren:

- a) Übertragung der Daten
- b) Umrechnung der Werte von Transmission in Absorption
- c) Bildung von Differenzspektren; insbesondere Subtraktion des Spektrums der verwendeten Ge-ATR-Platte vom Spektrum der mit der Probe beschichteten Platte

d) Bandenformanalyse

Die Spektren wurden sämtlich mit einer Schrittweite von

$\Delta v = 1.43 \text{ cm}^{-1}$ im Bereich von $4000 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ und

$\Delta v = 0.714 \text{ cm}^{-1}$ im Bereich von $2000 - 1000 \text{ cm}^{-1}$

aufgezeichnet.

Bandenformanalyse

Die Bandenformanalyse, d.h. die Zerlegung von Gesamtbanden in ihre Einzelbanden wurde mit einem in FORTRAN geschriebenen Programm durchgeführt, das wir im wesentlichen aus (22) übernommen haben und das nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate arbeitet. Es wurde um ein Unterprogramm erweitert, das es erlaubt, die berechneten Einzelbanden, die Gesamtbande (Summe der Einzelbanden) und die gemessenen Werte auf dem Calcomp-Plotter des Rechenzentrums darzustellen.

Das Programm nach (22) bietet die Möglichkeit, die Banden mit Gaußkurven, Cauchykurven oder einer Zwischenform aus beiden Kurvenformen anzupassen:

$$\text{Bandenform} = f \times \text{Gauß} + (1-f) \times \text{Cauchy} \quad 0 \leq f \leq 1$$

Ferner können einzelne Parameter wie Lage, Halbwertsbreite, Amplitude der Banden, der oben erwähnte Faktor f und der Verlauf einer Nulllinie auf einen vorgegebenen Wert fixiert werden.

Bestrahlungen

Die beschichteten Ge-ATR-Platten wurden in der Bildebene des Elektronenmikroskops Siemens Elmiskop Ia bestrahlt. Das Linsensystem und der Elektronenstrahler wurden mindestens 20 min vor Beginn der eigentlichen Bestrahlung eingeschaltet, um Schwankungen, die durch ein thermisches Ungleichgewicht des Systems hervorgerufen sein könnten, auszuschließen. Die Messung des Strahlstroms wurde über den isolierten Leuchtschirm des Elektronenmikroskops, der an ein Strommeßinstrument angeschlossen war, vorgenommen. Dabei wurde der Gesamtstrom I_g , der auf eine gleichmäßig ausgeleuchtete Kreisfläche vom Radius b fällt, bestimmt. Die Messeffektivität η_L des Leuchtschirms wurde zuvor mit Hilfe eines Faradaykäfigs (mit $\eta_F = 1$) ermittelt

zu $\eta_L = 0.634$. Damit konnte die jeweilige nominale Strahlendosis q_{nom} bestimmt werden aus:

$$q_{\text{nom}} = \frac{I_g \cdot t_B}{\eta_L \cdot \pi \cdot b^2} \quad t_B: \text{Bestrahlungsdauer}$$

Die Bestrahlungen wurden sämtlich bei einer nominalen Strahlungsleistung von $16.7 \text{ e}^-/\text{nm}^2 \cdot \text{h}$ durchgeführt.

Da die Elektronen am Substrat reflektiert werden, mußte zur Ermittlung der effektiven Bestrahlungsdosis q_{eff} eine neue Dosimetrie entwickelt werden, die im folgenden Abschnitt beschrieben ist.

C. Dosimetrie

Für Bestrahlungsexperimente ist es in unserem Fall notwendig, die zu untersuchenden Materialien auf Substrate aufzutragen, die bei weitem zu dick sind, um von den eingestrahnten (primären) Elektronen durchstrahlt zu werden. Um Rückschlüsse aus unseren Untersuchungen auf die Elektronenmikroskopie ziehen zu können, muß die Bestrahlungsdosis, hervorgerufen durch die Rückstreuung der Elektronen am Substrat, berücksichtigt werden, damit aus der eingestrahnten nominalen Dosis q_{nom} die effektive Dosis q_{eff} berechnet werden kann:

$$(1) \quad q_{\text{eff}} = F \cdot q_{\text{nom}}; \quad F > 1$$

Die effektive Dosis entspricht somit der Bestrahlungswirkung, der dieselben Materialien bei derselben Massenbelegung von $\sim 10^{-5} \text{ g/cm}^2$ im Transmissionselektronenmikroskop (auf Substraten der Massenbelegung von $\sim 10^{-6} \text{ g/cm}^2$) ausgesetzt wären.

Da bei unserer Versuchsanordnung die Primärelektronen senkrecht auf das Substrat auftreffen, ist die Wahrscheinlichkeit $P_{\vartheta}(\vartheta)d\Omega$, innerhalb des Raumwinkels $d\Omega = \sin\vartheta d\vartheta d\varphi$ am Substrat gestreut zu werden, unabhängig vom Azimut φ :

$$(2) \quad P_{\vartheta}(\vartheta) d\Omega = 2\pi \cdot P_{\vartheta}(\vartheta) \sin\vartheta d\vartheta$$

ϑ wird hierbei von der Senkrechten zum Substrat aus gezählt ($0 \leq \vartheta \leq 90^\circ$) (Abb. 4).

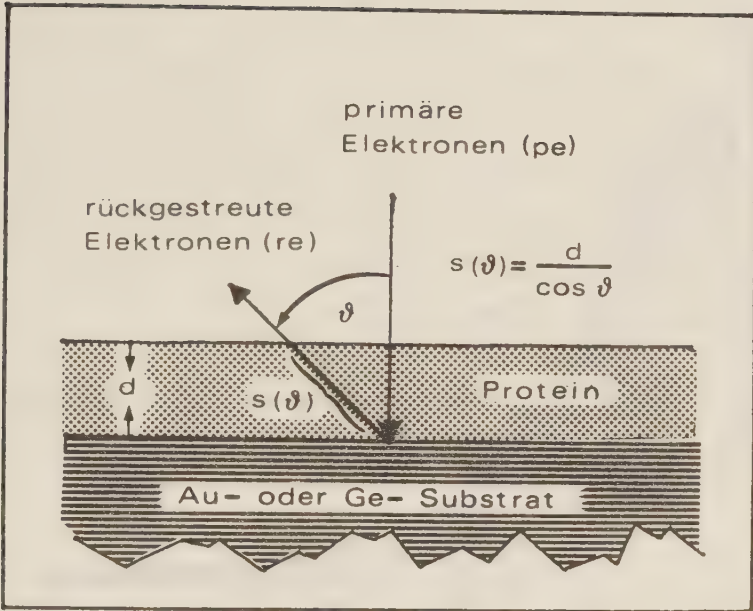


Abb. 4 Bei der Bestrahlung vorliegende Geometrie (Erläuterungen siehe Text)

Die rückgestreuten Elektronen weisen eine Energieverteilung $P_E \left(\frac{E}{E_0}; \vartheta \right) dE$, die von der einheitlichen Energie der Primärelektronen E_0 bis zu Energien von etwa 100 eV (siehe Abb. 5) reicht. Der Anteil der energiearmen Elektronen ist hierbei so gering, daß er im Verlauf der weiteren Berechnungen vernachlässigt werden kann.

Die Gesamtzahl der durch die primären und rückgestreuten Elektronen verursachten zerstörenden Effekte ZE ist gegeben zu:

$$(3) \quad ZE = \sum_i n_i \sigma_i$$

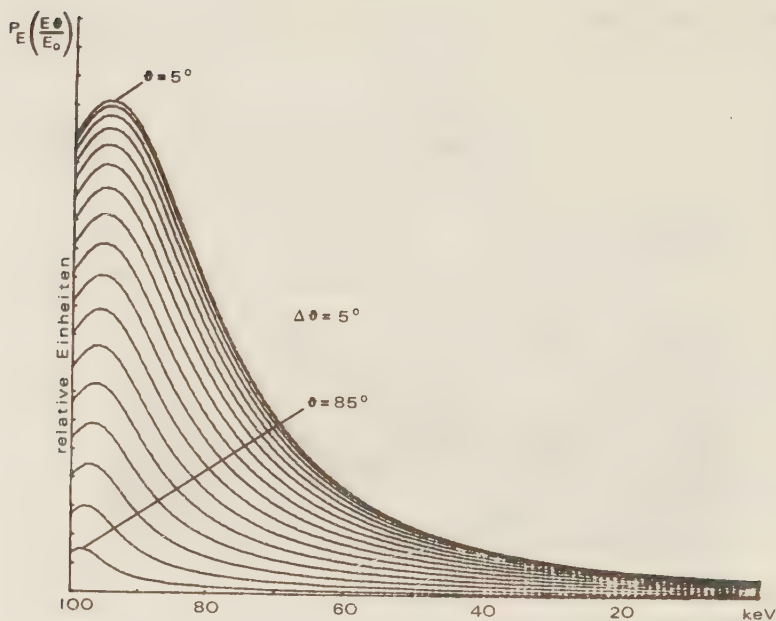


Abb. 5 Energieverteilung $P_E \left(\frac{E}{E_0} \right)$ rückgestreuter Elektronen

wobei n_i die Anzahl der Streuer der Art i (die als verantwortlich für die Zerstörungen betrachtet werden) pro Flächeneinheit ist und σ_i der dazugehörige Wirkungsquerschnitt. Der Gesamteinfluß der Primärelektronen p_e und der rückgestreuten Elektronen r_e wird angenommen zu:

$$(4) \quad \sigma_i = \sigma_{i,p_e}(E_0) + \sigma_{i,r_e}(\vartheta), \text{ wobei für } \sigma_{i,r_e} \text{ gilt:}$$

$$(5) \quad \sigma_{i,r_e} = \int_0^{E_0} P_E \left(\frac{E}{E_0}; \vartheta \right) \sigma_i(E) dE, \text{ und } P_E \left(\frac{E}{E_0}; \vartheta \right)$$

normiert ist:

$$(6) \quad \int_0^{E_D} P_E \left(\frac{E}{E_0}; \vartheta \right) dE = 1 \quad \text{für } 0 \leq \vartheta \leq \frac{\pi}{2}$$

Die am Substrat rückgestreuten Elektronen durchlaufen innerhalb des bestrahlten Materials der Dicke d eine Wegstrecke $s(\vartheta)$, die gegeben ist zu:

$$(7) \quad s(\vartheta) = d / \cos \vartheta \quad (\text{siehe Abb. 4})$$

und haben eine von dem Streuwinkel ϑ abhängige Häufigkeitsverteilung $P_\vartheta(\vartheta)$, die experimentell ermittelt wurde (37) und durch Lambert-Gesetz (42) angenähert werden kann:

$$(8) \quad P_\vartheta(\vartheta) = c \cdot \cos^n \vartheta, \quad \text{wobei } c \text{ sich bestimmt}$$

(n : eine ganze Zahl) zu:

$$(9) \quad c = (n + 1) / 2\pi \quad \text{durch die Normierungsbedingung:}$$

$$(10) \quad \int_{\Omega=0}^{2\pi} P_\vartheta(\vartheta; \varphi) d\Omega = 1$$

Eine Vereinfachung ergibt sich daraus, daß aus Messungen folgt, daß man für Ge, Au und andere schwere Elemente $n = 1$ setzen kann:

$$(11) \quad P_\vartheta = \cos \vartheta / \pi$$

Da nun jedes rückgestreute Elektron

$$(12) \quad Z E_{i, \text{re}} = s(\vartheta) \cdot \sigma_{i, \text{re}} \cdot n_i / d$$

zerstörende Effekte der Art i verursacht und wir pro einfallendes Primärelektron η rückgestreute Elektronen haben (η ist der Rückstreufaktor für ein gegebenes Substratmaterial) ($\eta_{\text{Ge}} = 0.33$ (57); $\eta_{\text{Au}} = 0.513$ (16)), ergibt sich die Gesamtzahl der zerstörenden Effekte dieser Art i durch Integration über ϑ zu:

$$(13) \quad Z E_i = n_i \left[\sigma_{i,pe}(E_0) + 2\pi\eta \int_0^{\pi/2} \sigma_{i,re}(\vartheta) P_{\vartheta}(\vartheta) \sin\vartheta (\cos\vartheta)^{-1} d\vartheta \right]$$

mit (11) vereinfacht sich (13) zu:

$$(14) \quad Z E_i = n_i \left[\sigma_{i,pe}(E_0) + 2\eta \int_0^{\pi/2} \sigma_{i,re}(\vartheta) \sin\vartheta d\vartheta \right]$$

Um $\sigma_{i,re}$ rechnerisch zu bestimmen durch Integration entsprechend der Gleichung (5), wurden die gemessenen Energieverteilungen $P_E(\frac{E}{E_0}; \vartheta)$ mit Cauchy-Kurven angenähert (44):

$$(15) \quad P_E\left(\frac{E}{E_0}; \vartheta\right) = \frac{1}{N(\vartheta)} \left[1 + \frac{x^2(2^{1/\mu} - 1)}{d_{1/2}^2} \right]^{-\mu}$$

$N(\vartheta)$ ist hierbei ein normierendes Polynom.

Für Gold- bzw. Germaniumsubstrat ermittelten wir folgende Werte:

$$(16a) \quad N(\vartheta)_{\text{Au}} = 0.299 + 0.063\vartheta - 0.256\vartheta^2 + 0.292\vartheta^3 - 0.134\vartheta^4$$

$$(16b) \quad N(\vartheta)_{\text{Ge}} = 0.364 - 0.188\vartheta + 0.463\vartheta^2 - 0.458\vartheta^3 + 0.106\vartheta^4$$

$$(17a) \quad d_{1/2, \text{Au}} = 0.187 \sqrt{\cos\vartheta}; \quad \mu_{\text{Au}} = \sqrt{1.3 - \sin\vartheta}; \quad x_{\text{Au}} = 1 - \frac{E}{E_0} - 0.054 \sqrt{\cos\vartheta}$$

$$(17b) \quad d_{1/2, \text{Ge}} = d_{1/2, \text{Au}}; \quad \mu_{\text{Ge}} = \mu_{\text{Au}}; \quad x_{\text{Ge}} = 1 - \frac{E}{E_0} - 0.1 \sqrt{\cos\vartheta}$$

Für die numerische Berechnung der Gleichung (14) können zwei unterschiedliche Arten von Streuquerschnitten herangezogen werden:

a) der unelastische atomare Streuquerschnitt (36):

$$(18) \quad \sigma_{ue,i}(E) = \frac{3}{4} \frac{\lambda_c^2 (\ln B - \beta^2)}{\pi \beta^2} \sum_i \sqrt{Z_i}$$

mit $\beta = \frac{\text{Elektronengeschwindigkeit}}{\text{Lichtgeschwindigkeit}}$

λ_c = Comptonwellenlänge

$$B = \frac{2E_0 \beta}{E_1} \sqrt{\frac{E (2 + \frac{E}{E_0})}{E_0 (1 - \beta^2)}}$$

$E_1 = 37\text{eV}$: mittlerer unelastischer Energieverlust pro Ereignis

$E_0 = 511.3\text{keV}$: Ruheenergie des Elektrons

Z_i = Kernladungszahl des Streuers i

b) der Gesamtstreuquerschnitt von molekularen Streuern, deren Atome und Bindungsart typisch sind für das untersuchte Material (54):

$$(19) \quad \sigma_{g,i} = \frac{\lambda_c^2 M_i^2}{\pi \beta^2} \left\{ \ln \frac{c_i E_0 \beta^2}{2(1 - \beta^2)} - \beta^2 \right\}$$

mit den Konstanten M_i^2 und c_i für unterschiedliche Bindungstypen, die aus Messungen an Kohlenwasserstoffgasen gewonnen wurden (55):

Bindungstyp:	M_i^2	$c_i \cdot \text{eV}$
C - H	1.07	0.134
(C - C)	2.5	0.068
(C - C)	0.4	0.107
C ₆ H ₆ -Ringe	24.2	0.102

Für das Molekül der Katalase, das für die von uns untersuchten globulären Proteine als repräsentativ gelten kann, haben wir (28) mit der Gleichung (14) nach Summierung über i für σ_{ue} aus a) für den Faktor F aus (1)

$$(20a) \quad F_{ue,Au} = 1 + \frac{\eta}{\sigma_a(E_0)} \int_0^{\pi/2} \int_0^{E_0} \sigma_a(E) P_E\left(\frac{E}{E_0}; \theta\right) \frac{P_\theta(\theta)}{\cos \theta} dE d\Omega = 1. + 1.70 = 2.70$$

$$(20b) \quad F_{ue,Ge} = 1 + 1.26 = 2.26$$

und für σ_g aus b):

$$(21a) \quad F_{g,Au} = 1 + 1.56 = 2.56$$

$$(21b) \quad F_{g,Ge} = 1 + 1.14 = 2.14$$

erhalten.

Somit liefern die Streuquerschnitte aus a) und b) gut übereinstimmende Faktoren F.

D. Experimenteller Teil

Überblick über die IR-Spektroskopie der Polypeptide und Proteine

Eine aussagefähige IR-Spektroskopie vielatomiger Moleküle, bei denen theoretisch $3N-6$ (N = Anzahl der Atome) mögliche Schwingungen auftreten können, ist bedingt durch das Auftreten charakteristischer Schwingungen einzelner Atomgruppierungen in den betreffenden Molekülen (66). Die Schwingungen dieser Gruppierungen findet man innerhalb bestimmter Wellenzahlbereiche. Tritt zudem eine Kopplung von Schwingungen ein, so bewirkt dies eine Aufspaltung und ein Auseinanderwandern von Banden durch Fermi-Resonanz. Dieser Effekt kann immer dann eintreten, wenn die Wellenzahlwerte der Schwingungen nicht zu sehr voneinander abweichen. Koppeln nun nicht nur die Schwingungen einer Gruppierung, sondern auch die benachbarter Gruppierungen, so kann man aus den dadurch bedingten Veränderungen an den Banden (Aufspaltung) Schlüsse auf die Sekundärstruktur von Makromolekülen ziehen.

Die IR-Spektroskopie erweist sich für die Unterscheidung von α -Helix, β -Struktur und ungeordneter Struktur von Proteinen und Polypeptiden als besonders geeignet.

Die Schwingungen der Peptidgruppen im Proteinrückgrat lassen sich einteilen in fünf in-plane (in der CONH-Ebene) und drei out-of-plane Formen. Bei 3300 und 3100 cm^{-1} findet man je eine kräftige Bande, die als Amid A- bzw. Amid B-Bande bezeichnet werden. Während die Amid-A-Bande im wesentlichen die NH-Valenzschwingung ist, ist die Amid-B-Bande die erste Oberschwingung der bei ca. 1550 cm^{-1} befindlichen Amid II-Schwingung, die durch Fermi-Resonanz mit der NH-Valenzschwingung verstärkt wird. Sehr kräftige Banden werden durch die Amid I-Schwingung um 1650 cm^{-1} und durch die Amid II-Schwingung um 1550 cm^{-1} verursacht. Amid I ist im wesentlichen die C=O-Valenzschwingung, Amid II hat einen C-N-Valenz- und einen NH-Deformations-schwingungsanteil. Diese beiden Banden sind für die Bestimmung der Sekundärstruktur besonders geeignet. Die weiteren Amid-Banden III, IV, V und VI sind von geringerer Bedeutung (51).

Die Schwingungen der einzelnen Peptidgruppen im Rückgrat der Protein- und Polypeptidmoleküle sind durch Wasserstoffbrücken schwach gekoppelt. Damit liegt im Protein- und Polypeptidrückgrat eine Anordnung identischer Oszillatoren vor. Da diese Kopplung durch die Art der vorliegenden Struktur bestimmt wird, ist die Lage und Intensität der Amid-Banden konformationsabhängig. Miyazawa (49) hat mittels Störungsrechnung den Einfluß dieser Kopplung auf die Schwingungen bei α -Helix und β -Struktur von Modell-

Tabelle I

Konformation		Amid I ν $[\text{cm}^{-1}]$	Amid II ν $[\text{cm}^{-1}]$
Random coil		1658 k	1535 k
α -Helix	vII	1650 k	1516 s
	vI	1647 m	1546 k
Parallele β -Struktur	vII	1648 s	1530 k
	vI	1632 k	1550 s
Antiparallele β -Struktur	vII	1685 s	1530 k
	vI	1632 k	

Berechnete Lage (53) und beobachtete Stärke der Schwingungen in der Amid I und Amid II Region .

(k: kräftig ; m: mittel; s: schwach)

vII, vI : Orientierung der Schwingung zum Rückgrat

verbindungen ermittelt und die in der Tabelle I wiedergegebenen Werte für die Lage und Intensität der wichtigsten dieser Schwingungen in der Amid I und Amid II-Region ermittelt.

Für die von uns durchzuführenden Bandenformanalysen der Amid I- und Amid II-Banden der Proteinspektren war diese Vorauskenntnis über die ungefähre Lage und Zuordnung der zu separierenden Einzelbanden von besonderer Wichtigkeit.

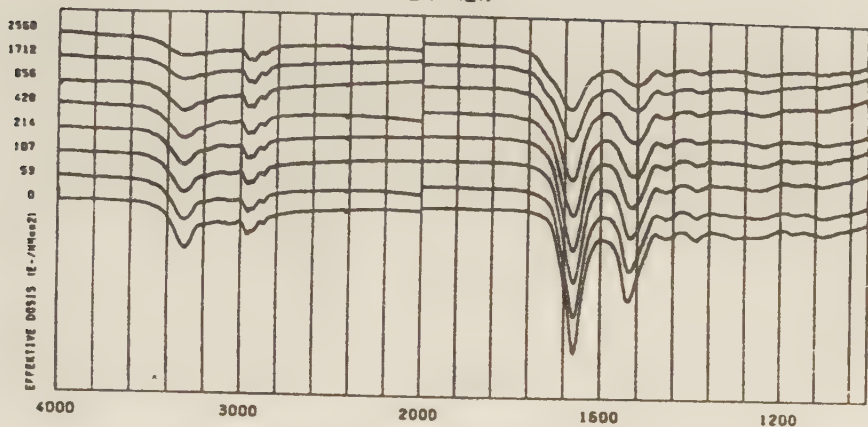
Massenverlust

Die offensichtlichste Wirkung bei Bestrahlung ist der Massenverlust des Objekts, der sich in den IR-Spektren der bestrahlten Proteine und den zugehörigen Differenzspektren (Abb. 6 - 12) in der Abnahme der Gesamtabsorption in Abhängigkeit von der Dosis äußert. Auffallend ist dabei das unterschiedliche Verhalten der Absorptionsbanden, die von den an der Peptidbindung beteiligten Atomgruppen herrühren, und denen, die durch die Absorption der Methyl- und Methylengruppen der Seitenketten bedingt sind.

CH₂- und CH₃-Banden

Die Banden, die der symmetrischen und antisymmetrischen CH₃ und CH₂ Streckschwingung ($\sim 2870 \text{ cm}^{-1}$ - 2960 cm^{-1}) und der CH₃ und CH₂ Deformationsschwingung ($\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$) zugeordnet werden, werden selbst bei hohen Dosen nur geringfügig schwächer. Diese Beobachtung stimmt mit früheren Ergebnissen überein, daß nämlich Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten besonders resistent gegen Strahlenschäden sind (7). Aminosäureanalyse bestrahlter Proteine zeigte, daß die Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin, die mit ihren langen Seitenketten hauptsächlich

MYOGLOBIN: ABSORPTIONSSPEKTREN



DIFFERENZSPEKTREN $S(Q>0) - S(Q=0)$: MYOGLOBIN

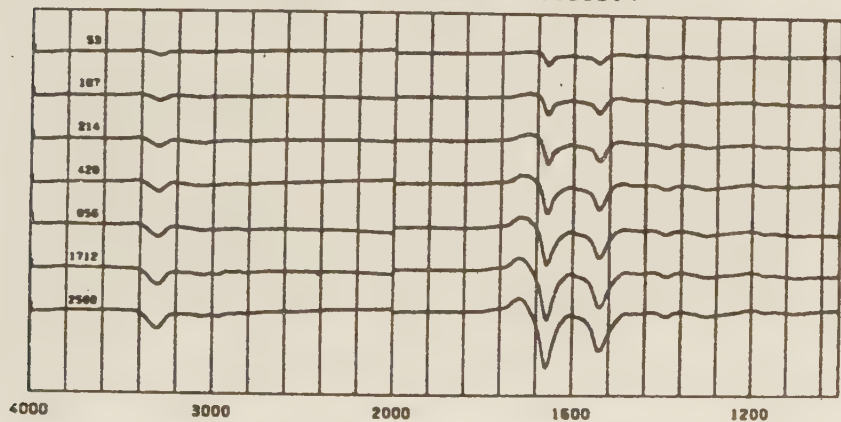
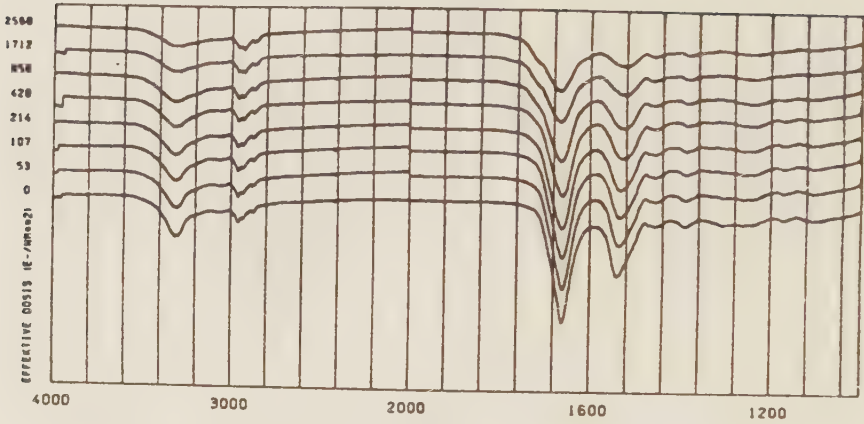


Abb. 6 Absorptionsspektren und Differenzspektren der Bestrahlungsreihe bei Myoglobin

HAEMOGLOBIN: ABSORPTIONSSPEKTREN



DIFFERENZSPEKTREN $S(Q>0) - S(Q=0)$, HAEMOGLOBIN

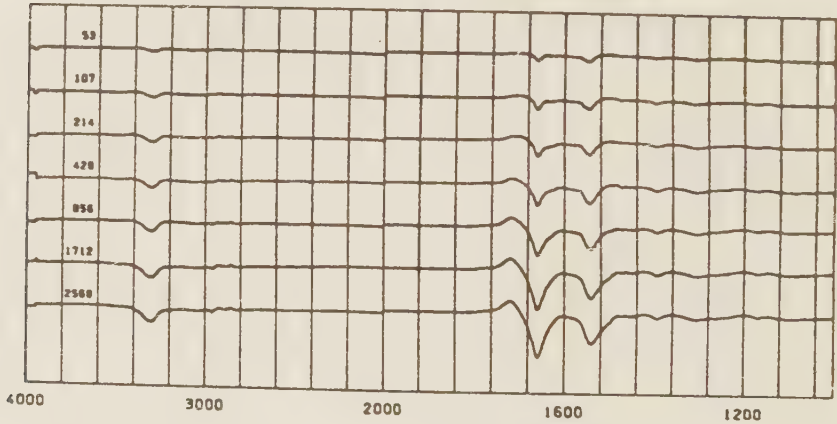
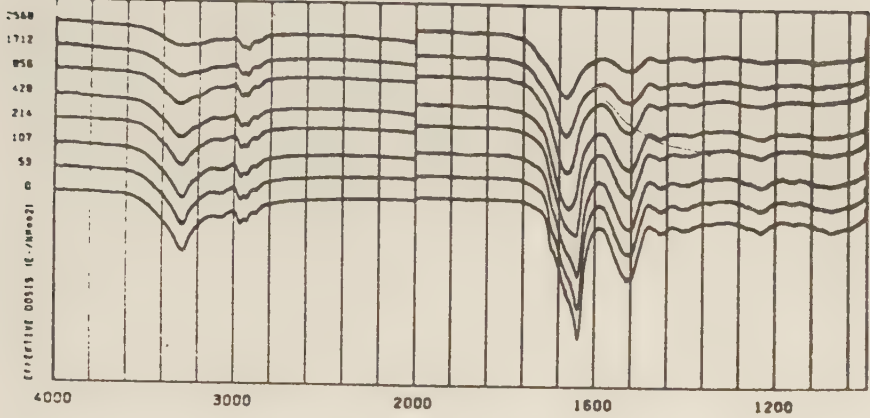


Abb. 7 Wie Abb. 6

Haemoglobin

CONCAVALIN-A: ABSORPTIONSSPEKTREN



DIFFERENZSPEKTREN $S(IQ>0) - S(IQ=0)$, CONCAVALIN-A

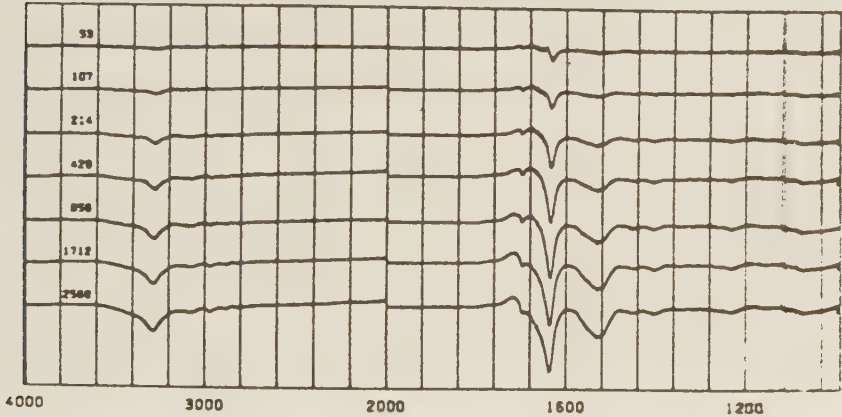
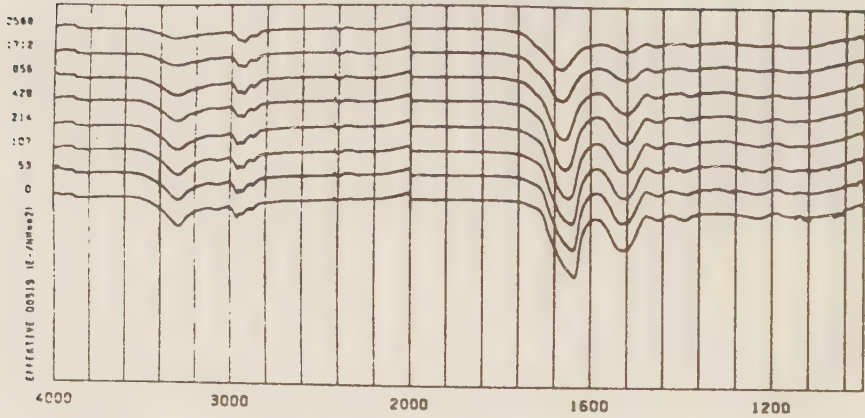


Abb. 8 Wie Abb. 6

Concanavalin-A

BETA-LACTOGLOBULIN: ABSORPTIONSSPEKTREN



DIFFERENZSPEKTREN $S(Q>0) - S(Q=0)$, BETA-LACTOGLOBULIN

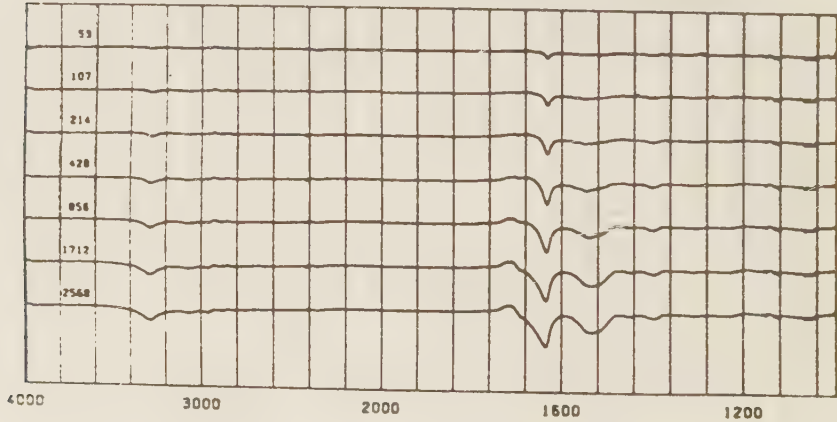
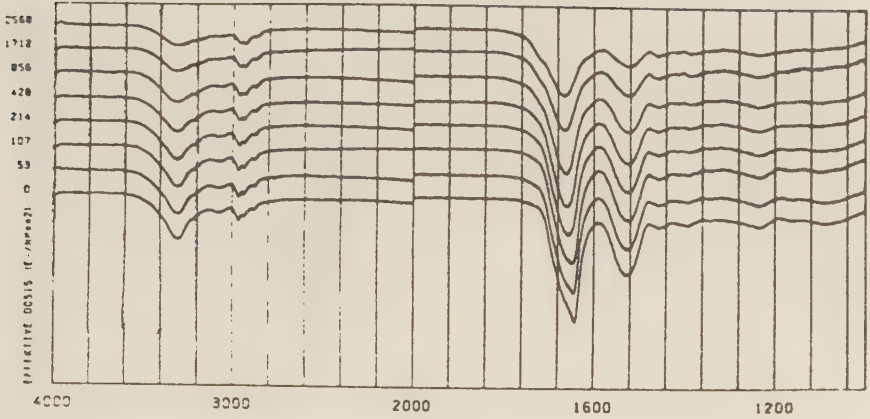


Abb. 9 Wie Abb. 6

β -Lactoglobulin

CHYMOTRYPSIN: ABSORPTIONSSPEKTREN



DIFFERENZSPEKTREN $S(Q>0) - S(Q=0)$, CHYMOTRYPSIN

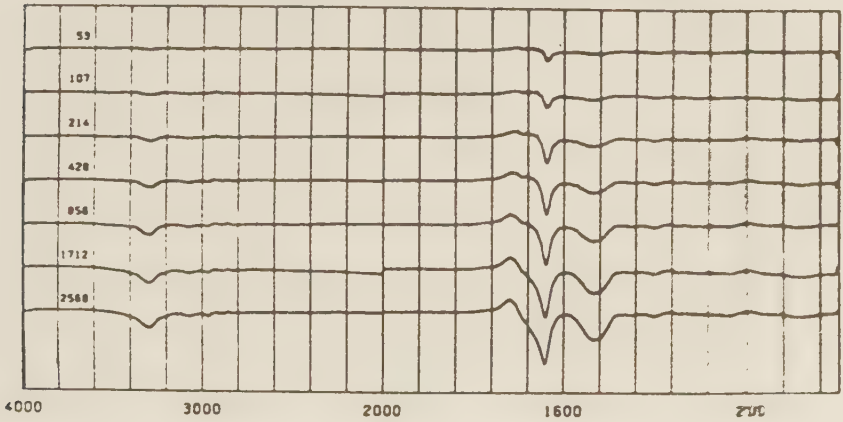
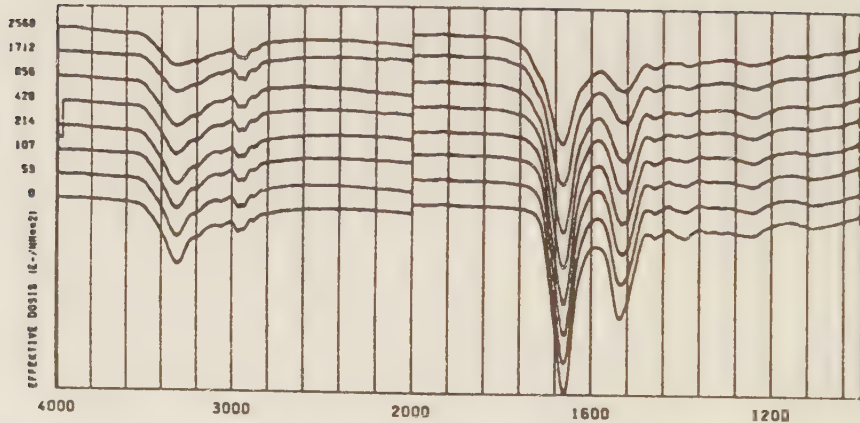


Abb. 10 Wie Abb. 6

Chymotrypsin

LYSOZYM: ABSORPTIONSSPEKTREN



DIFFERENZSPEKTREN $S(I>0) - S(I=0)$: LYSOZYM

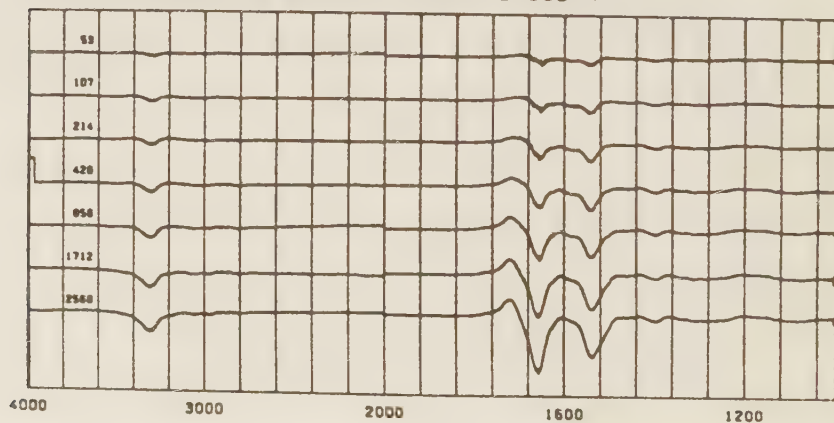
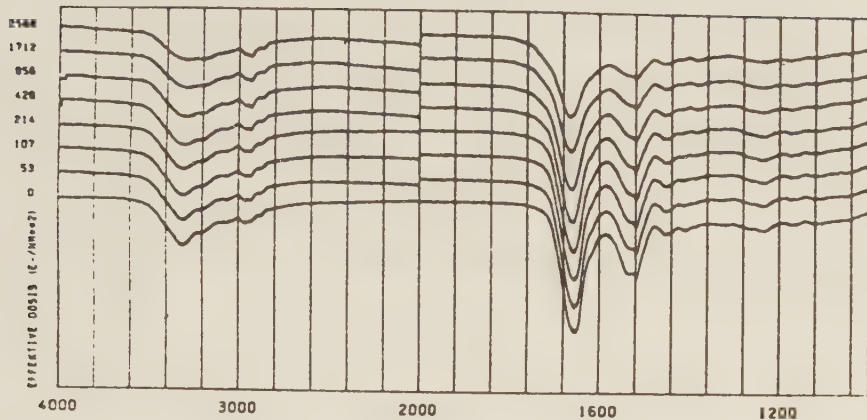


Abb. 11 Wie Abb. 6

Lysozym

TRYPSIN INHIBITOR, ABSORPTIONSSPEKTREN



DIFFERENZSPEKTREN $S(Q>0) - S(Q=0)$, TRYPSIN INHIBITOR

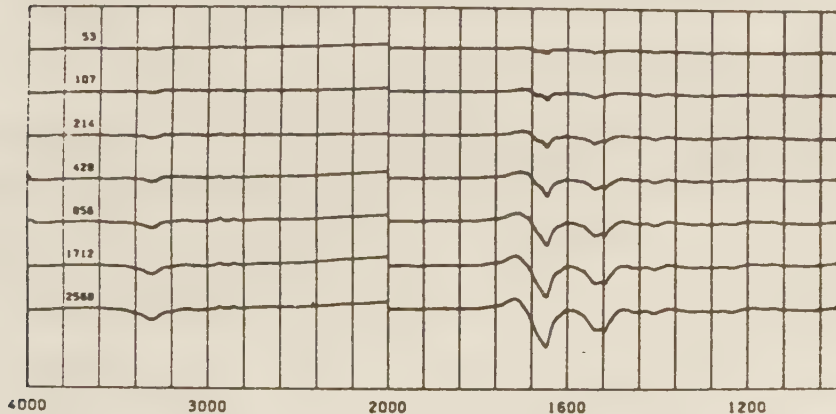


Abb. 12 Wie Abb. 6

Trypsin-Inhibitor

zu den obengenannten Absorptionsbanden beitragen, kaum durch Bestrahlung geschädigt werden. Hinzu kommt, daß polare Aminosäuren, insbesondere Glutaminsäure und Asparaginsäure, die bei Bestrahlung sich als hochempfindlich erwiesen haben, teilweise in Aminosäuren mit einfachen aliphatischen Seitenketten (α -Aminobuttersäure, Alanin) transformiert werden und zusätzlich zu obigen Absorptionsbanden beitragen.

COO^- -Bande

Mit den Ergebnissen in (7) ist ebenfalls das vollständige Verschwinden der Bande bei 1400 cm^{-1} , die der symmetrischen COO^- -Strettschwingung zugeordnet wird, zu erklären. Diese Bande ist bei der Dosisstufe von $214\text{ e}^-/\text{nm}^2$ nicht mehr feststellbar. Die polaren Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure, deren Seitenketten diese Schwingung verursachen, haben sich als sehr strahlenempfindlich herausgestellt. Dieses bedeutet nicht, daß Aminosäuren mit sauren Seitenketten selektiv zerstört werden. Aminosäuren mit basischen Seitenketten haben (7) etwa gleich hohe Empfindlichkeit, jedoch kann das Verhalten der Banden, die durch die Schwingungen der Seitenketten dieser Aminosäuren verursacht werden, nicht beobachtet werden, da sie sich im Bereich der weitaus stärkeren Amid I- und II-Banden befinden und von diesen völlig überdeckt werden.

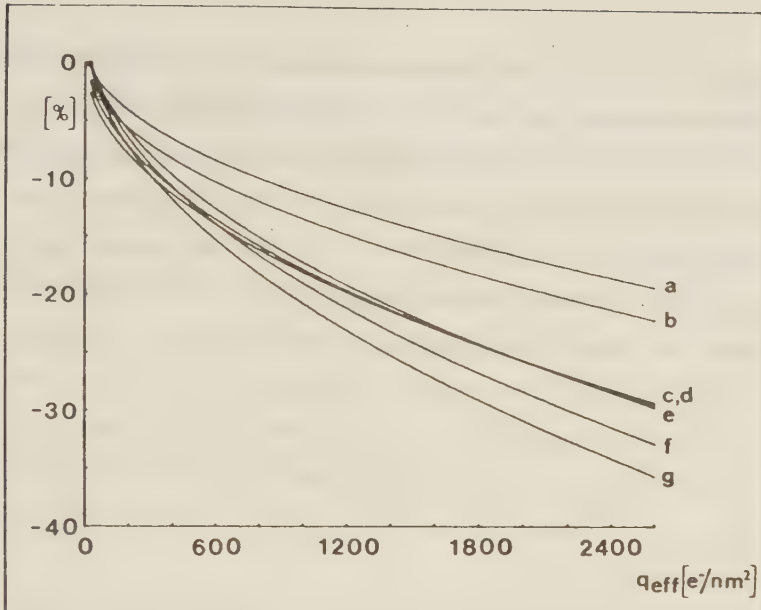


Abb. 13 Abnahme der Gesamtabsorptionsintensität der Amid I- und Amid II-Banden.

a: Trypsin-Inhibitor, b: Lysozym, c;d: Myoglobin, Haemoglobin, e: Chymotrypsin, f: Concanavalin-A, g: β -Lactoglobulin

Amid I-, Amid II-Bande

Bei Veränderungen in der Amid I- und II-Region lassen sich zwei Dosisbereiche unterscheiden: Bis $500 e^-/nm^2$ nimmt vor allem die Feinstruktur der Banden ab; im Bereich darüber wird die Gesamtfläche der Banden gleichmäßig geringer. Dieses Verhalten äußert sich deutlich in der Abb. 13. Für alle untersuchten Proteine ist die prozentuale Ab-

nahme der Absorptionsbanden zunächst steil abfallend und geht ab $500 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ in einen flacheren Kurventeil über. Der Kurvenverlauf korreliert für diese Proteine mit ihrer Sekundärstruktur. Am stärksten nimmt die Absorption der Proteine mit hohem β -Strukturanteil ab (e: Chymotrypsin, f: Concanavalin-A, g: β -Lactoglobulin), die beiden Proteine mit hohem α -Helixgehalt (c: Haemoglobin, d: Myoglobin) nehmen eine mittlere Stellung ein und haben annähernd den gleichen Verlauf. Die Proteine mit gemischt α -helikalem als auch β -Strukturanteil (a: Trypsin-Inhibitor, b: Lysozym) zeigen die geringste Abnahme der Absorptionsintensität.

Wie weit die Absorptionsabnahme in den Amid I- und Amid II-Banden den Massenverlust der entsprechenden Moleküle wiedergibt, bedarf einer genaueren Betrachtung. Die Amid I-Region wird hauptsächlich der C=O-Streckschwingung ($\sim 80\%$) zugerechnet mit kleineren Anteilen von der C-N Streck- ($\sim 10\%$) und N-H Deformationsschwingung ($\sim 10\%$), während die Amid II-Bande ihren Ursprung in der C-N Streck- ($\sim 40\%$) und der N-H Deformationsschwingung ($\sim 60\%$) hat. Wird das Verhältnis der Amid II zur Amid I-Bande über der Dosis aufgetragen (Abb. 14 und Abb. 15), so wird offensichtlich, daß die Amid II-Bande bis zur Dosis von $\sim 500 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ bedeutend stärker als die Amid I-Bande abnimmt. Oberhalb $500 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ bleibt das Verhältnis der beiden Banden zueinander konstant. Die Schlußfolgerung

ist, daß bis zur Dosis von $\sim 500 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ vorwiegend N-H Bindungen aufgebrochen sind und keine Rekombination stattgefunden hat. Die steile Abnahme der Absorption ist somit unterhalb von $500 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ nicht proportional zum Gesamtmassenverlust, sondern reflektiert eher die Zerstörung einer bestimmten Bindung. Die gute Übereinstimmung der Werte der Gesamtabsorptionsabnahme für den

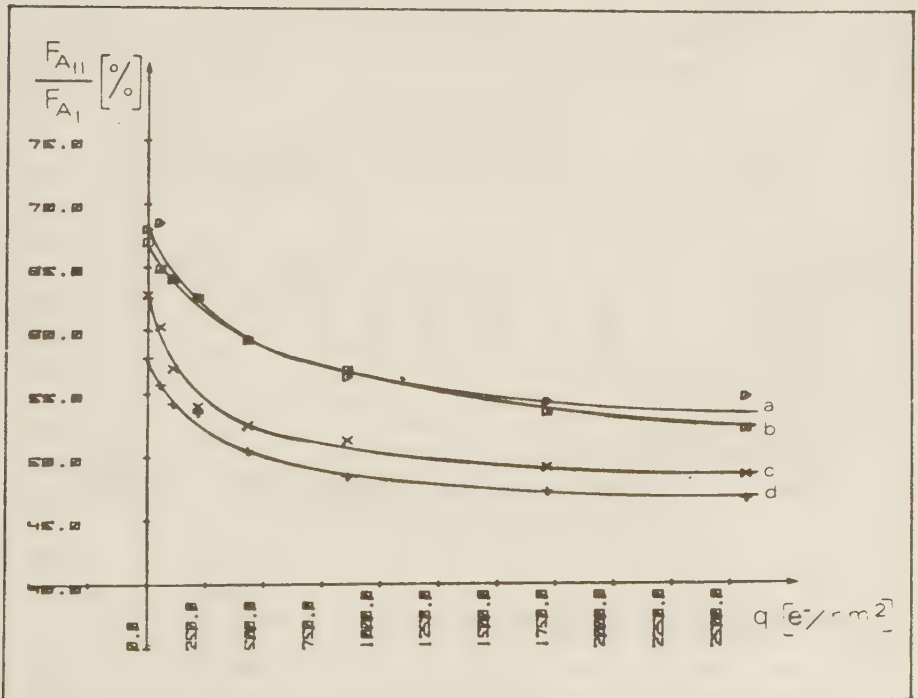


Abb. 14 Verhältnis der Flächen der Amid II- und Amid I-Banden als Funktion der Dosis. a: Myoglobin, b: Haemoglobin, c: Lysozym, d: Trypsin-Inhibitor

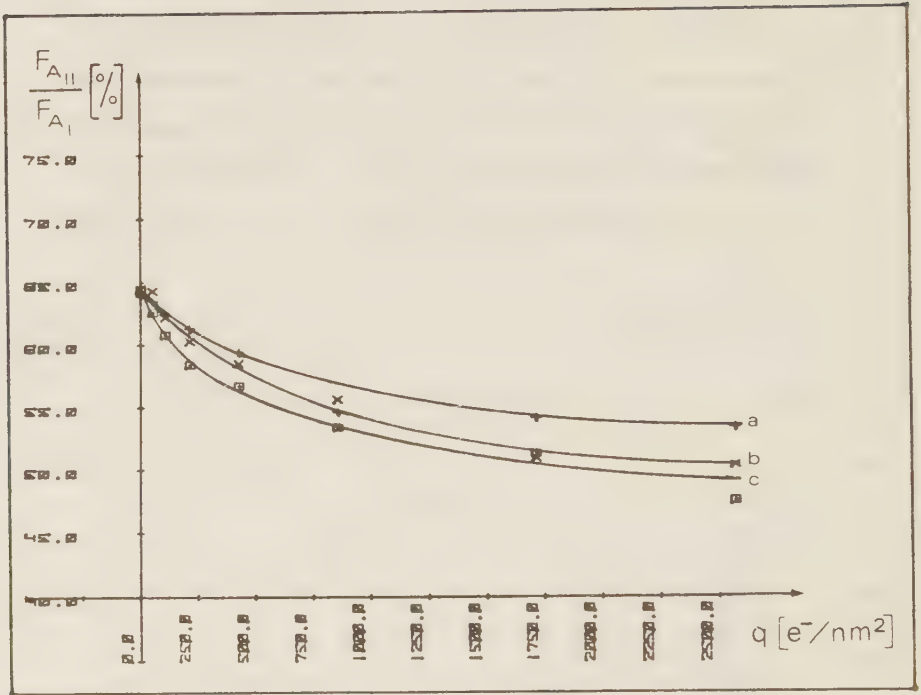


Abb. 15 Verhältnis der Flächen der Amid II- und Amid I-Banden als Funktion der Dosis. a: Concanavalin-A, b: Chymotrypsin, c: β -Lactoglobulin

Bereich oberhalb $500 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ mit den Ergebnissen für Massenverlustmessungen in (17) (z.B. nimmt die Gesamtabsorptionsintensität des Myoglobins bei $2000 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ um $\sim 25\%$ ab; für diese Dosis wurde in (17) für F-pili ein Massen-

verlust von ca. 30 % gemessen) legt die Schlußfolgerung nahe, daß der Gesamtmassenverlust durch die Absorptionsabnahme der Amid I- und Amid II-Banden in diesem Bereich wiedergegeben wird. Dieses bedeutet wiederum, daß die Intensitätsabnahme der Gesamtabsorption proportional dem Verlust der durch die Bestrahlung entstandenen Molekülfragmente an das umgebende Vakuum ist.

Bestrahlungen von Homopolypeptiden

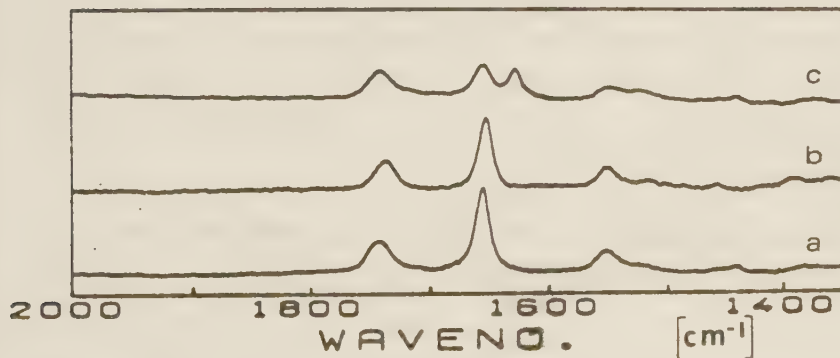


Abb. 16 Spektren der unbestrahlten Homopolypeptide.
a: Polymethylglutamat, b: Polybenzylglutamat
(a und b α -helikal), c: Polymethylglutamat
(Mischstruktur)

Um Einblick in das Verhalten von Proteinen auf Sekundärstrukturebene zu gewinnen, haben wir zunächst Bestrahlungen an einfachen Modellverbindungen wie Poly- γ -methyl-L-glutamat (PMG) und Poly- γ -benzyl-L-glutamat (PBG) durchgeführt. Die Monolayer lagen je nach zur Spreitung an Wasser-Luft-Grenzfläche verwendetem Lösungsmittel entweder in α -helikaler oder in einer Mischstruktur (α -Helix - β -Struktur) vor. In Abb. 16 sind die Spektren der unbestrahlten Homopolypeptide wiedergegeben, wobei a und b Spektren des PMG bzw. des PBG in α -helikaler Konformation und c das Spektrum des PMG mit Mischstruktur im Wellenzahlenbereich von $2000 - 1350 \text{ cm}^{-1}$ wiedergeben. Die auftretenden Banden sind: Ester-Carbonyl-Bande (C=O -Valenzschwingung) bei $\sim 1735 \text{ cm}^{-1}$; Amid I-Bande bei $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$, wobei in c die Amid I-Bande in α -Helix und β -Strukturannteil (~ 1655 bzw. $\sim 1627 \text{ cm}^{-1}$) aufspaltet; Amid II-Bande bei $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$.

In den Abbildungen 17 und 18 sind die Spektrenreihen der bestrahlten Homopolypeptide wiedergegeben.

Da die Monolayer eine Schichtdicke von nur etwa $20 \text{ \AA}$ aufweisen, wurden die Spektren mit einer spektralen Spaltbreite von 1.6 cm^{-1} registriert, um genügendes Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten.

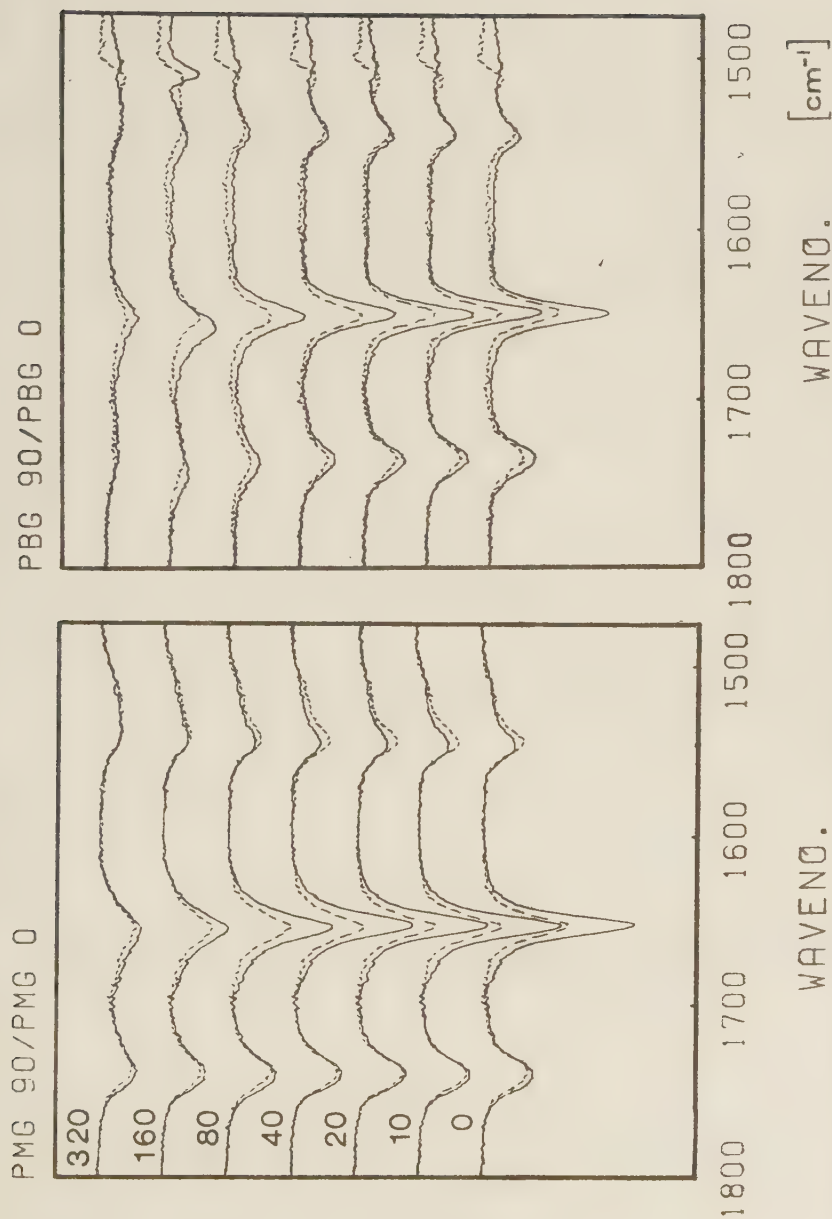


Abb. 17 Spektren der Bestrahlungsreihen bei PMG und PBG. Durchgezogene Kurve: Komponente des elektrischen Lichtvektors parallel, gestrichelte Kurve: senkrecht zur Molekülachse. Zahlenreihe links gibt die Dosis in e^-/nm^2 wieder

PMG (BETA-S.)

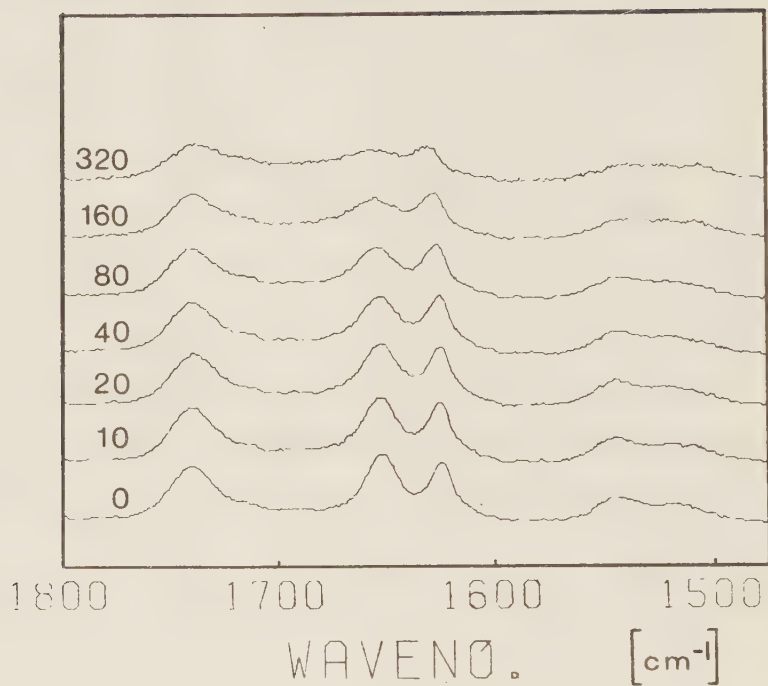
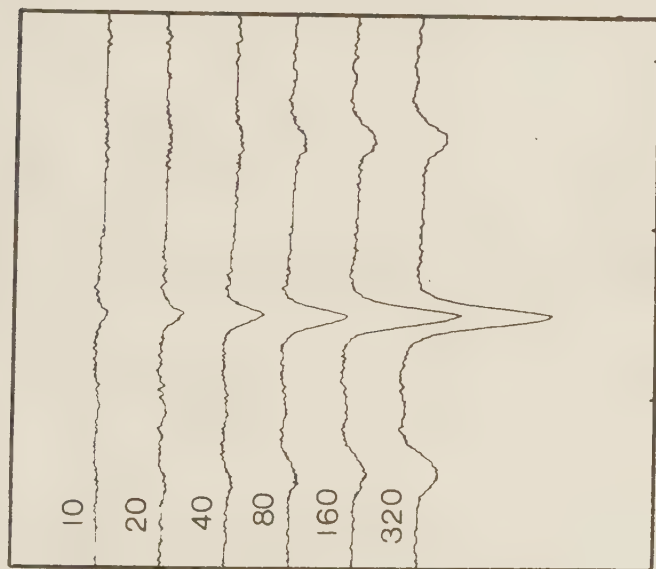


Abb. 18 Spektren der Bestrahlungsreihe des PMG mit Mischstruktur (mit unpolarisiertem Licht registriert). Zahlenreihe links: Dosis in e^-/nm^2

PMG DIFF. SPEKTREN



PMG DIFF. (BETA-S.)

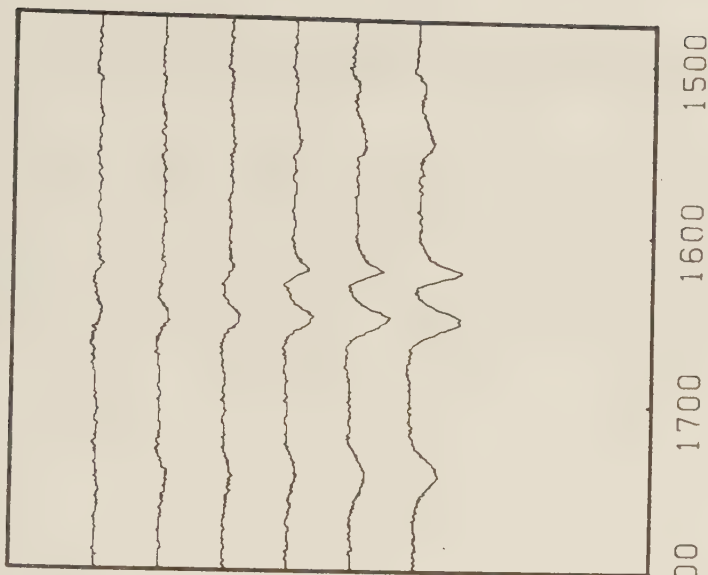


Abb. 19 Differenzspektren der Bestrahlungsreihen bei PMG. Zahlenreihe links gibt die Bestrahlungsdosis in e^-/nm^2 wieder

Bandenformanalyse bestrahlter Homopolypeptide

Zur quantitativen Untersuchung der Sekundärstruktur der Homopolypeptide wurde aus den Spektren bestrahlter Proben der Bereich der Amid I-Bande ($1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) einer Bandenformanalyse unterzogen. Die graphische Darstellung ist in Abb. 20 wiedergegeben. Die Banden wurden mit reinen Cauchy-Funktionen (auch Lorenz-Funktionen genannt) angepaßt. Im Verlauf unserer Untersuchungen hat sich diese Funktion als am besten geeignet für die Wiedergabe der IR-Absorptionsbanden erwiesen (65).

Die relative, d.h. auf den Wert bei der Dosis $q = 0 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ bezogene Abnahme der Absorptionsintensität als Funktion der Dosis ist in Abb. 21 wiedergegeben. Auffallend ist die geringe Abnahme der $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$ -Bande bei PMG mit Mischstruktur (Kurve a). Die insgesamt geringere Absorptionsabnahme des PMG mit Mischstruktur korreliert mit dem Ergebnis für den Massenverlust der Proteine mit Mischstruktur. Bei diesen Proteinen war die Gesamtabsorptionsabnahme, ebenfalls erheblich geringer als bei denen mit überwiegend α - oder β -Struktur. Der signifikant langsamere Abfall der Absorption der α -Helix/Random-coil-Bande bei Vorhandensein der Mischstruktur kann in der Weise gedeutet werden, daß während der Bestrahlung eine Transformation von β -Struktur in α -Helix und erst anschließend von α -Helix in Random-coil stattfindet.

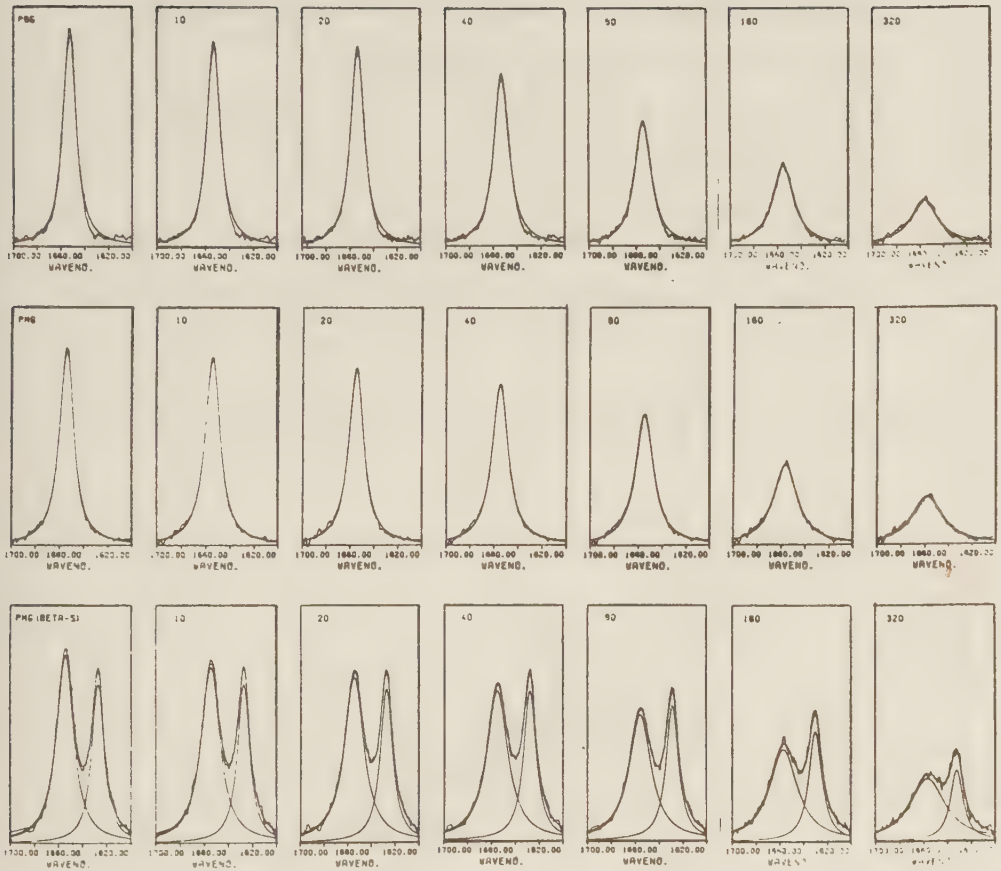


Abb. 20 Bandenformanalyse der Amid I-Bande bei Polybenzylglutamat (oben), Polymethylglutamat (mitte), beide α -helikal, Polymethylglutamat (unten) mit Mischstruktur

Dieser Mechanismus hätte eine energieabsorbierende Wirkung und somit einen geringeren Massenverlust zur Folge. Diese Deutung würde auch mit den Ergebnissen in (58), wo rechnerisch

risch das Verhalten von Sekundärstrukturen bei Bestrahlung ermittelt wurde, übereinstimmen.

Die Kurven c und d zeigen durch ihre Ähnlichkeit auf ein ansonsten weitgehend gleiches Verhalten der untersuchten Homopolypeptide bezüglich Massenverlust hin.

Es gelang uns mit der Bandenformanalyse nicht, die α -Helix und Random-coil-Banden, die um 3 bis 5 Wellenzahlen auseinanderliegen (48), aufzulösen, um deren Verhalten

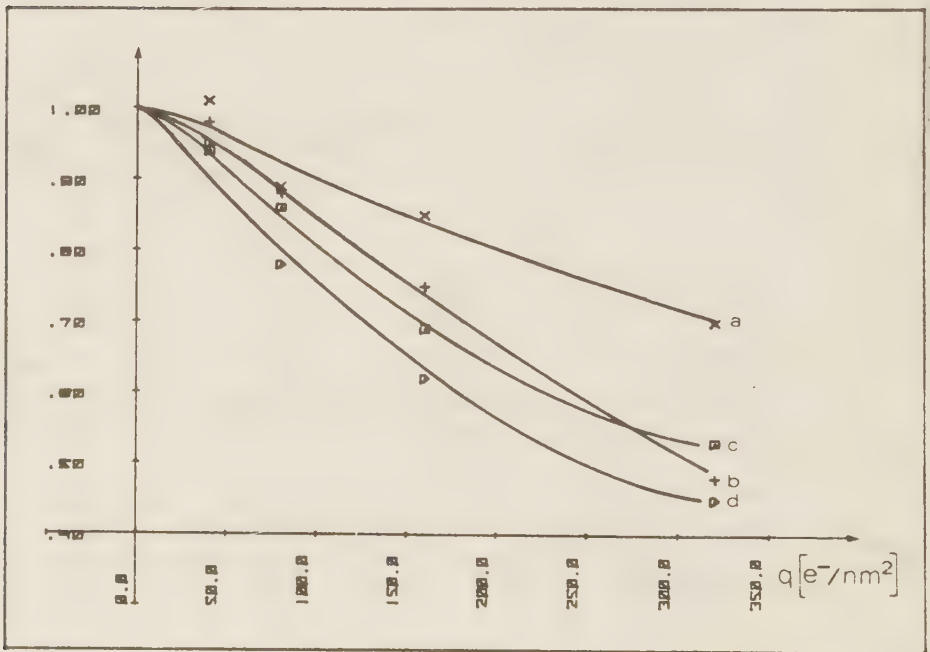


Abb. 21 Relative Abnahme der Absorptionsintensität der Banden aus Abb. 20. a: α -Helix/Random-coil-Bande bei PMG mit Mischstruktur, b: β -Struktur-Bande bei PMG mit Mischstruktur, c und d: α -Helix/Random-coil-Bande bei PBG und PMG ohne β -Strukturanteil

Tabelle II

Dosis [e^-/nm^2]	PMG ($\alpha - H$)		PBG ($\alpha - H$)		PMG (α, β)		PMG (α, β)	
	Lage [cm^{-1}]	$\Delta x_{1/2}$ [cm^{-1}]	Lage	$\Delta x_{1/2}$	Lage	$\Delta x_{1/2}$	Lage	$\Delta x_{1/2}$
0	1654,8	14.20	1652.5	12.81	1654.5	16.90	1627.3	12.28
10	1654.9	15.02	1652.9	13.25	1655.1	18.37	1627.8	12.19
20	1655.0	15.10	1653.3	13.70	1654.8	19.80	1627.5	12.54
40	1655.2	16.43	1652.9	15.12	1655.0	21.23	1627.9	12.90
80	1655.0	18.31	1654.2	17.11	1656.0	22.23	1629.2	12.73
160	1656.6	24.27	1655.1	21.20	1656.8	28.70	1630.1	13.26
320	1657.0	30.77	1656.4	27.57	1656.8	35.45	1632.3	12.86

Lage der Banden und deren Halbwertsbreite ($\Delta x_{1/2}$: Halbwertsbreite)
für Polymethylglutamat und Polybenzylglutamat in α - helikaler Kon-
formation ($\alpha - H$) und Polymethylglutamat in α - und β - Konformation (α, β).

explizite untersuchen zu können. Es folgt aber aus den berechneten Werten für die Lage und Halbwertsbreite der Gesamtbande bei $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$ (siehe Tabelle II), daß eine Transformation von α -Helix zur Random-coil, d.h. eine Randomisierung stattfindet, denn es findet zunächst eine Verschiebung der Bande aus Richtung der α -Helix-Lage in Richtung der Random-coil-Lage statt um bis zu 4 Wellenzahlen. Ferner verdoppelt sich die Halbwertsbreite der Gesamtbande. Diese Verbreiterung deutet ebenfalls auf das Vorhandensein zweier Banden. Im Vergleich dazu findet bei der β -Struktur-Bande, die klar aufgelöst ist, keine Verbreiterung der Bandenhalbwertsbreite statt. Auffallend ist bei dieser Bande die signifikante Verschiebung in Richtung zu höheren Wellenzahlen hin. Diese Verschiebung folgt aus der Abnahme der Fermiresonanz und ist offensichtlich bedingt durch die Entkopplung der Schwingungen der an der β -Struktur beteiligten Atomgruppen von den Schwingungen restlicher Atomgruppen des Moleküls. Ob bei der Entkopplung mehr die Strangbrüche im Molekül oder der allgemeine Massenverlust eine Rolle spielen, kann nicht entschieden werden.

Strahlenschutzwirkung durch aromatische Gruppen

Da die Moleküle des Polymethyl- und Polybenzylglutamat geordnet und zwar parallel mit ihrer Molekülachse zur Längsseite der ATR-Plattenkante aufgetragen waren, konnte

für die beiden Substanzen das dichroitische Verhältnis der Banden in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis untersucht werden. Mit diesem Experiment sollte überprüft werden, ob dem Benzylsubstituenten im PBG eine Strahlenschutzwirkung, wie sie in (1, 62) als allgemeine Eigenschaft von aromatischen Substituenten beschrieben wird, zukommt. Nach (1) soll eine Benzylgruppe eine Schutzwirkung bis über eine Distanz von zwölf Kohlenstoffatomen ausüben.

In Abb. 17 sind die Spektren der Bestrahlungsreihe des PMG und PBG dargestellt. Die Spektren für die Polarisationsrichtungen mit E-Vektorkomponente (E-Vektor: elektrischer Lichtvektor) parallel zur Molekülachse (durchgezogene Linie) und E-Vektorkomponente senkrecht dazu (gestrichelt) sind übereinander aufgetragen. Man sieht zunächst, daß eine sehr gute Fernordnung der Moleküle erzielt worden ist, sowohl bei PMG (dichroitische s Verhältnis bei Dosis $q = 0 \text{ e}^-/\text{nm}^2 : 1 : 1.82$) als auch bei PBG ($1 : 1.61$). (Dichroitisches Verhältnis wurde nur für die Amid I-Bande bestimmt, da die Amid II-Bande zu schwach ausgeprägt ist) Die Abb. 22 gibt das dichroitische Verhältnis als Funktion der Dosis wieder, wobei Kurve a sich auf Polymethylglutamat und Kurve b auf Polybenzylglutamat bezieht. Der beträchtlich geringere Abfall des dichroitischen Verhältnisses für Polybenzylglutamat (Kurve b) bestätigt die Strahlenschutzwirkung durch den Benzylsubstituenten. Beim qualitativen Ver-

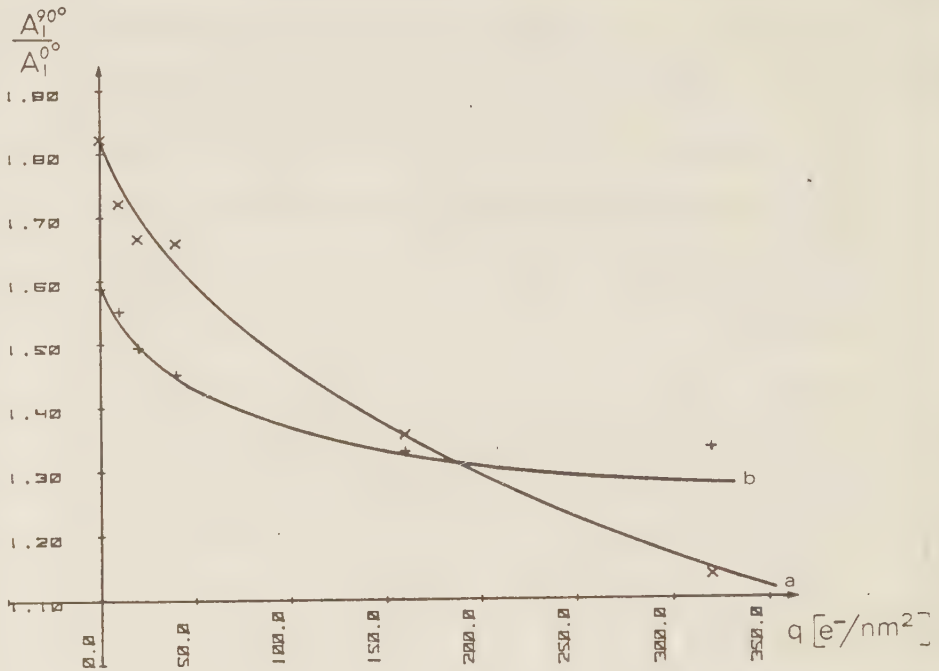


Abb. 22 Dichroitisches Verhältnis in der Amid I-Bande bei PMG (Kurve a) und PBG (Kurve b) als Funktion der Dosis

gleich der Spektren des PMG und PBG fällt sofort der starke Rückgang der Ester-Carbonyl-Bande ($\sim 1735 \text{ cm}^{-1}$) beim Polybenzylglutamat auf, während diese Bande beim Polymethylglutamat vergleichsweise gut erhalten bleibt. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten beim PBG wäre, daß die Energie der bei der Bestrahlung auftref-

fenden Elektronen zunächst durch den Benzylsubstituenten aufgenommen wird und anschließend auf die Ester-Karbonyl-Bindung übertragen wird, was eine Spaltung dieser Bindung und somit eine Energieminderung zur Folge hat.

Bestrahlungen von globulären Proteinen

Charakterisierung der verwendeten Proteine

Die von uns für die Bestrahlungsexperimente verwendeten Proteine lassen sich in drei Gruppen einteilen: Proteine mit überwiegend α -helikaler Sekundärstruktur (Haemoglobin, Myoglobin), Proteine mit einem hohen Anteil an β -Struktur (Concanavalin-A, Chymotrypsin, β -Lactoglobulin) und schließlich Proteine mit einer Mischstruktur (Lysozym, Trypsin-Inhibitor). In Tabelle III sind für die oben aufgeführten Proteine die Aminosäurenanteile der entsprechenden Sekundärstrukturen an der Gesamtzahl der Aminosäuren im Molekül angegeben. Die Werte, die auf Röntgendaten basieren, wurden aus (46) entnommen. Für β -Lactoglobulin, das wir ebenfalls untersucht haben, existieren zur Zeit keine Röntgendaten. Aus den Infrarotspektren des β -Lactoglobulin kann man aber anhand der Gestalt der Amid I-Bande mit großer Sicherheit schließen, daß es sich bei diesem Protein um eines mit hohem β -Strukturgehalt handelt. In unseren Untersuchungen haben wir es dieser Proteingruppe zugeordnet.

Tabelle III

-54-

Protein	Anzahl Aminosäuren	α -Helix		β -Struktur		Random-coil	
		N α	%	N β	%	N R	%
Myoglobin	153	134	67,6	--	--	9	5,9
Hämoglobin	287	246	85,7	--	--	19	6,6
Concanavalin-A	237	6	2,5	153	64,6	27	11,4
Chymotrypsin	245	26	10,6	129	48,6	32	13,1
Lysozym	129	59	45,7	25	19,4	16	12,4
Trypsin-Inh.	58	15	25,9	26	44,8	8	13,8

Sekundärstruktur der verwendeten Proteine nach (46).

N α , N β , N R : Anzahl der Aminosäuren, die an entsprechender Sekundärstruktur beteiligt sind. Für β -Lactoglobulin ist die Sekundärstruktur nicht bekannt.

Bandenformanalyse der Amid I- und Amid II-Banden

Für die Bandenformanalyse der Amid I- und Amid II-Banden wurde aus den in den Abbildungen 6 - 12 dargestellten Spektren der Bereich zwischen 1720 und 1480 cm^{-1} entnommen. Bei den Proteinen gestaltet sich die rechnerische Separierung der Banden wesentlich schwieriger als bei den von uns untersuchten Homopolypeptiden. Sowohl in der Amid I- als auch in der Amid II-Region sind neben den starken Banden, die von den Amidschwingungen herrühren, und die je nach Sekundärstruktur in Banden mit unterschiedlichen Frequenzen aufspalten, Absorptionsbanden von Seitenketten der Aminosäuren vorhanden. Zum einen ist es die asymmetrische COO^- -Valenzschwingung bei etwa 1570 cm^{-1} , die von Residuen mit sauren Seitenketten herrührt (Asparaginsäure, Glutaminsäure), zum anderen NH , NH_2 , NH_3^+ Deformationsschwingungen, deren Ursache Aminosäuren mit basischen Seitenketten sind (Lysin, Arginin, Histidin) (11, 23). Da die Auflösung dieser vergleichsweise schwachen Banden die Bandenformanalyse der Proteinspektren zusätzlich komplizieren würde, wurde bis auf die $\sim 1515\text{ cm}^{-1}$ -Bande auf deren Separierung verzichtet unter Inkaufnahme einer etwas schlechteren Anpassung der Meßdaten durch die berechneten Banden.

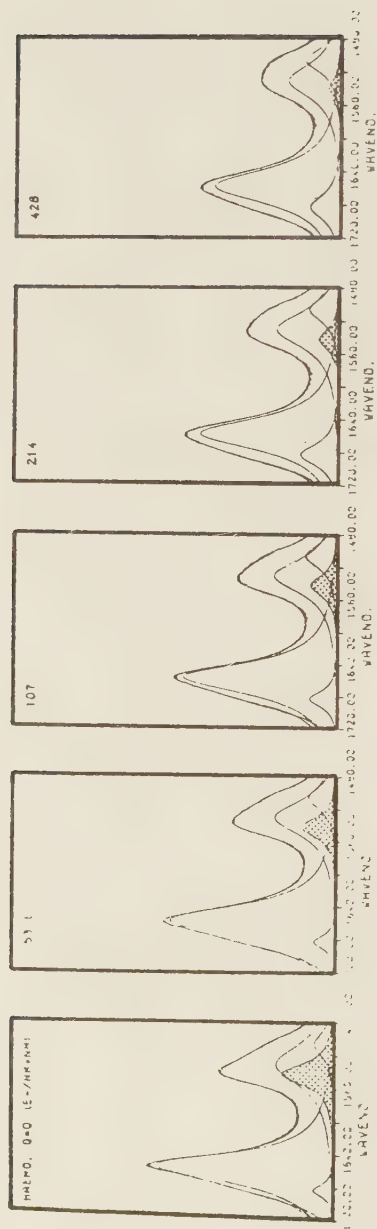


Abb. 23
 Bandenformanalysen des Haemoglobins
 für die Amid I- und Amid II-Region.
 Die jeweiligen Elektronendosen
 oben links.
 Schraffiert; in der Amid II-Region
 separierte, der α -helikalen Konfor-
 mation zugehörige Absorptionsbande

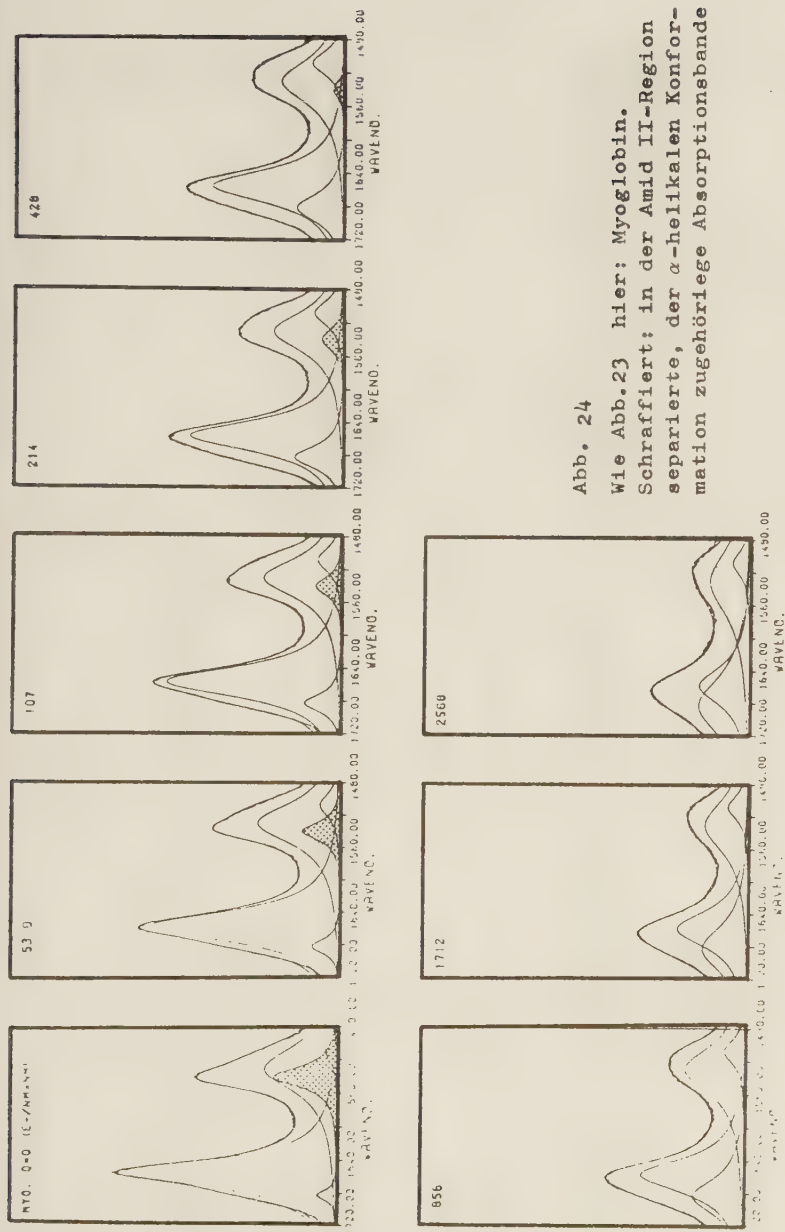


Abb. 24

Wie Abb.23 hier: Myoglobin.
 Schraffiert: in der Amid II-Region
 separierte, der α -helikalen Konfor-
 mation zugehörige Absorptionsbande

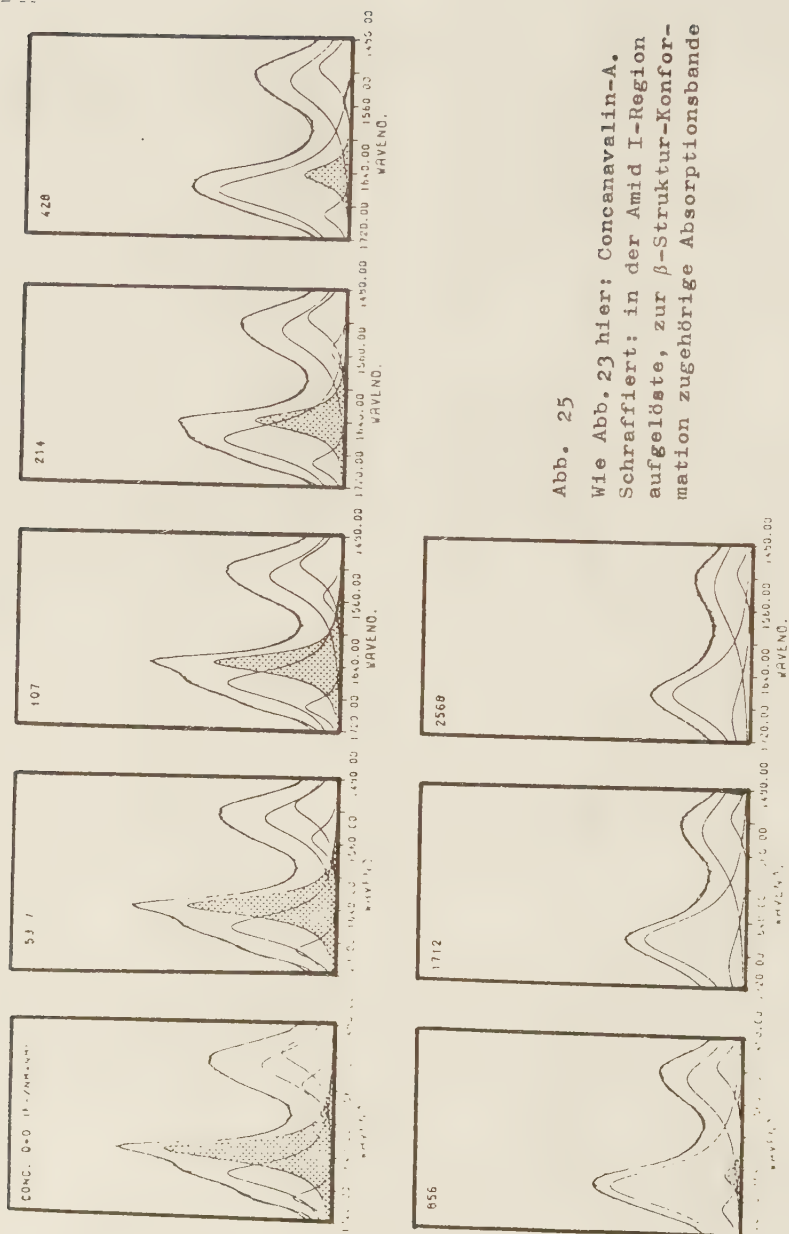


Abb. 25

Wie Abb. 23 hier: Concanavalin-A.
Schraffiert: in der Amid I-Region
aufgelöste, zur β -Struktur-Konfor-
mation zugehörige Absorptionsbande

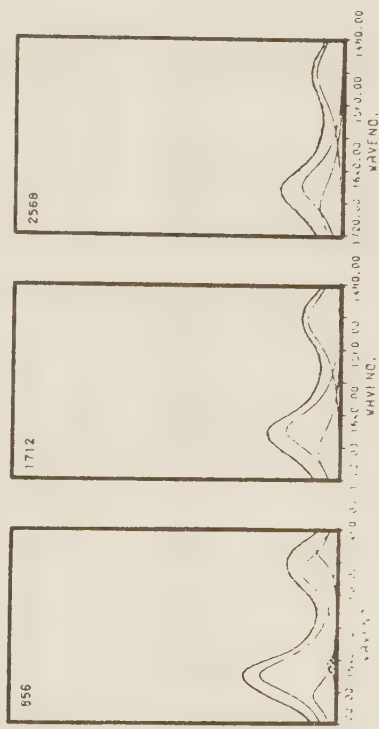
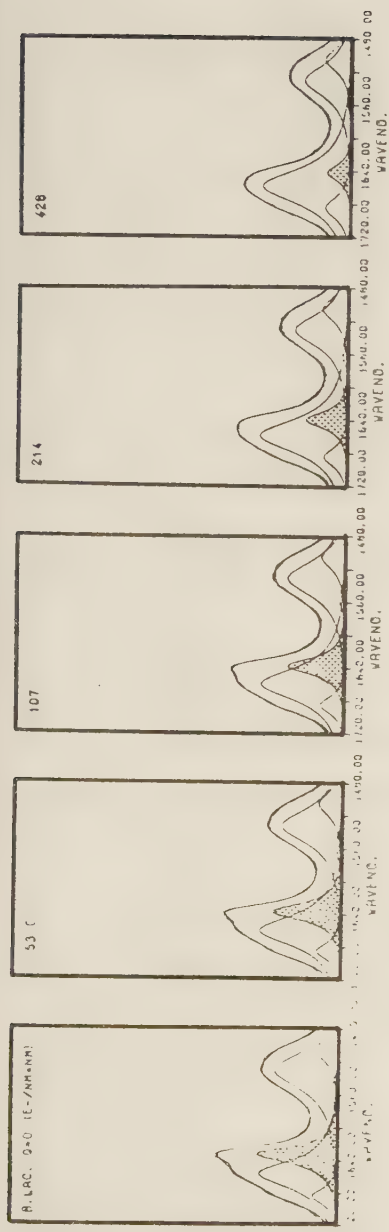


Abb. 26

Wie Abb. 23 hier: β -Lactoglobulin.
Schraffiert: in der Amid I-Region
aufgelöste, der β -Struktur-Konfor-
mation zugehörige Absorptionsbande

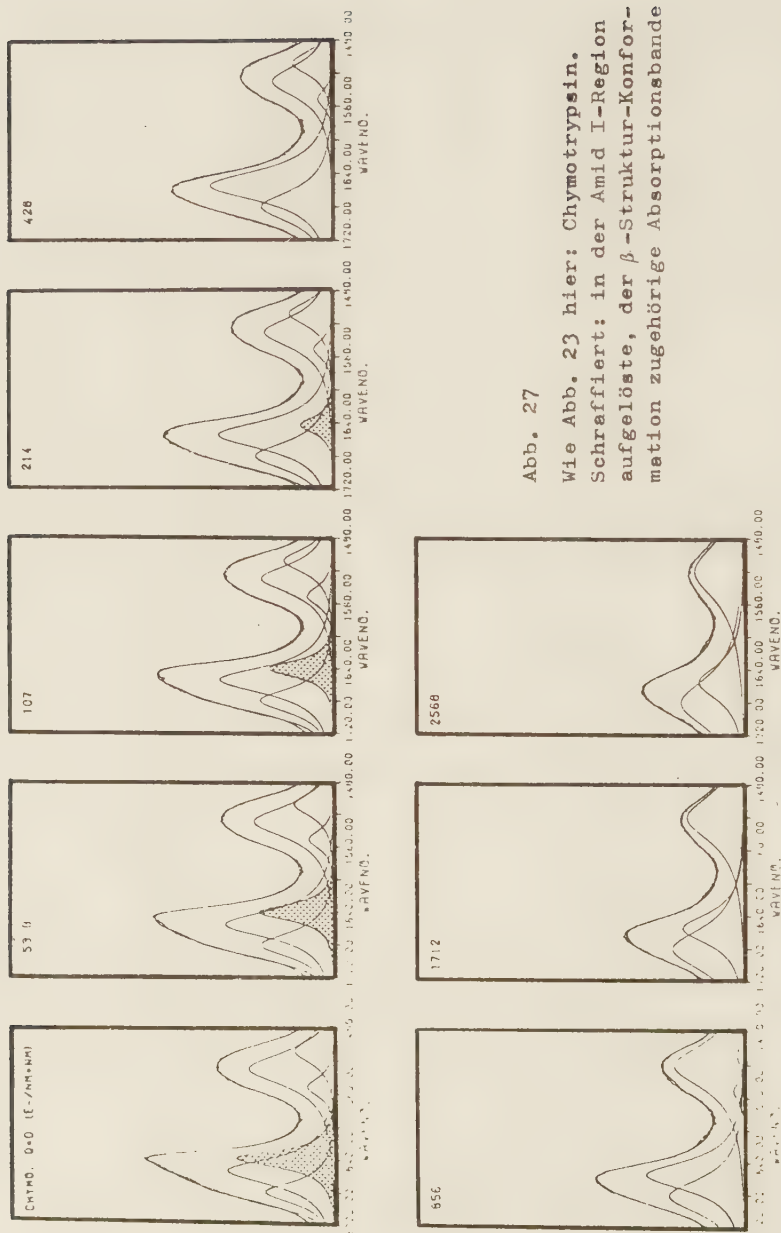


Abb. 27

Wie Abb. 23 hier: Chymotrypsin.
Schraffiert: in der Amid I-Region
aufgelöste, der β -Struktur-Konfor-
mation zugehörige Absorptionsbande

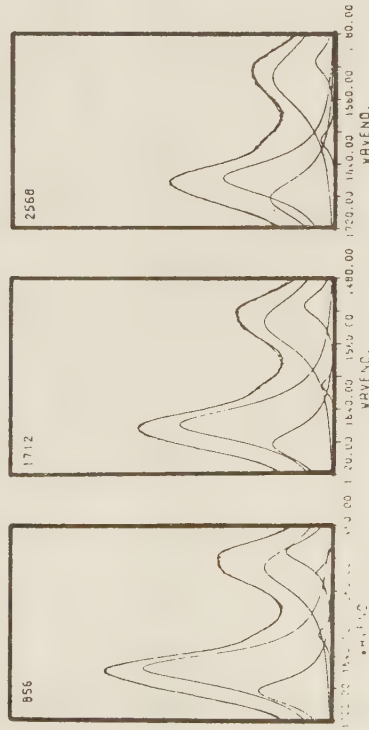
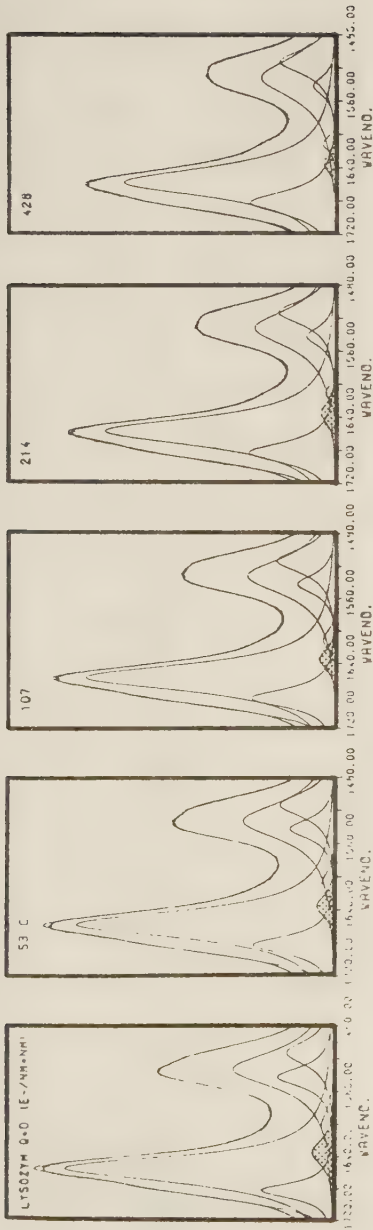


Abb. 28

Wie Abb. 23 hier: Lysozym.
 Schraffiert: in der Amid I-Region
 aufgelöste, der β -Konformation
 zugehörige Absorptionsbande.
 Dicht neben dieser Bande (bei
 $\sim 1610 \text{ cm}^{-1}$) eine von den Seiten-
 ketten herrührende, sehr strahlen-
 resistente Absorptionsbande (sehr
 deutliche Schulter in der Amid I-
 Region bei hohen Dosen)

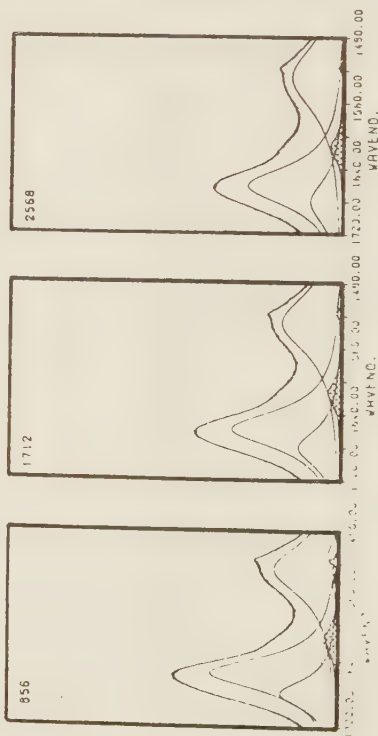
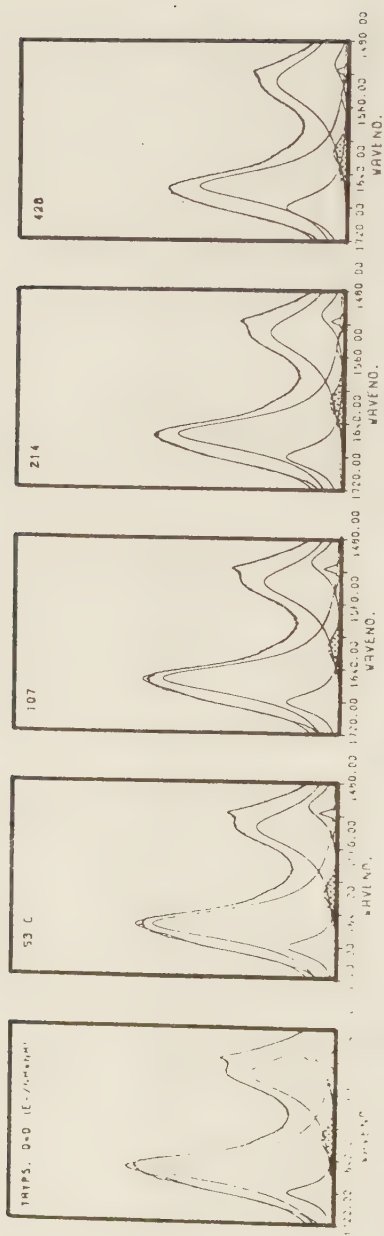


Abb. 29

Wie Abb. 23 hier: Trypsin-Inhibitor.
Schraffiert: bei diesem Protein eine
Gesamtbande aus der Absorptionsbande
der β -Struktur-Konformation und einer
von den Seitenketten herrührenden
Absorptionsbande

β -Struktur-Bande (Amid I-Region)

Relativ einfach konnte die Separierung der β -Struktur-Bande in der Amid I-Region für die Proteine, die überwiegend β -Struktur enthalten (siehe Tabelle II), erreicht werden. Der Grund dafür ist, daß die Lage dieser Bande ($\sim 1635 \text{ cm}^{-1}$) sich um mehr als 15 Wellenzahlen von der Lage der α -Helix-Bande ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$) unterscheidet. Hinzu kommt, daß wir auf Grund der Bandenformanalyse des Poly- γ -methyl-L-glutamats, das einen β -Strukturanteil enthielt, folgern konnten, daß die Halbwertsbreite dieser Bande während der Bestrahlung einen konstanten Wert behält. Wurde die Bandenformanalyse der Amid I-Bande der bestrahlten Spektren mit fixierter Halbwertsbreite (27 cm^{-1}) durchgeführt, so ergaben sich die in der Tabelle IV angegebenen Verhältnisse. Die Halbwertsbreite von 27 cm^{-1} für die β -Struktur-Bande wurde aus einer Reihe von Bandenformanalysen, die mit unterschiedlichen, fixierten Halbwertsbreiten der β -Struktur-Bande durchgeführt wurden, ermittelt. Beim Wert von 27 cm^{-1} ergab sich die im Mittel kleinste Standardabweichung. Die Intensitätsabnahme der Bande läßt sich bis zur Dosis $q = 856 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ bei β -Lactoglobulin und Concanavalin-A und bis zur Dosis $q = 214 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ bei Chymotrypsin verfolgen. Die Empfindlichkeit dieser Bande und damit der β -Struktur ist für alle drei Proteine etwa gleich. Die graphische Darstellung für β -Lactoglobulin und Concana-

Tabelle IV

q [e^-/nm^2]	α - Helix		β - Struktur			
	Haemo. $F_{1541.5} [\text{cm}^{-1}]$	Myo. $F_{1540.0} [\text{cm}^{-1}]$	β - Lacto.		Conc.-A	
			v	F	v	F
0	1	1	1634.7	1	1636.1	1
53	0.68	0.54	1635.9	0.85	1637.4	0.89
107	0.52	0.40	1637.1	0.72	1637.5	0.75
214	0.39	0.37	1639.1	0.52	1639.4	0.54
428	0.26	0.17	1641.4	0.30	1642.0	0.28
856	0.12	--	1645.2	0.12	1647.6	0.10
1712	0.02	--	--	--	--	--
2568	--	--	--	--	--	--

Relative Fläche F (auf Fläche der Bande bei $q = 0$ [e^-/nm^2] bezogen).

der α -Helix -Bande für Haemoglobin und Myoglobin und der β -Bande für β -Lactoglobulin, Concanavalin-A, Chymotrypsin. Bei der β -Bande ist zusätzlich ihre Lage bei entsprechender Dosisstufe angegeben;

v : Lage der β -Bande [cm^{-1}].

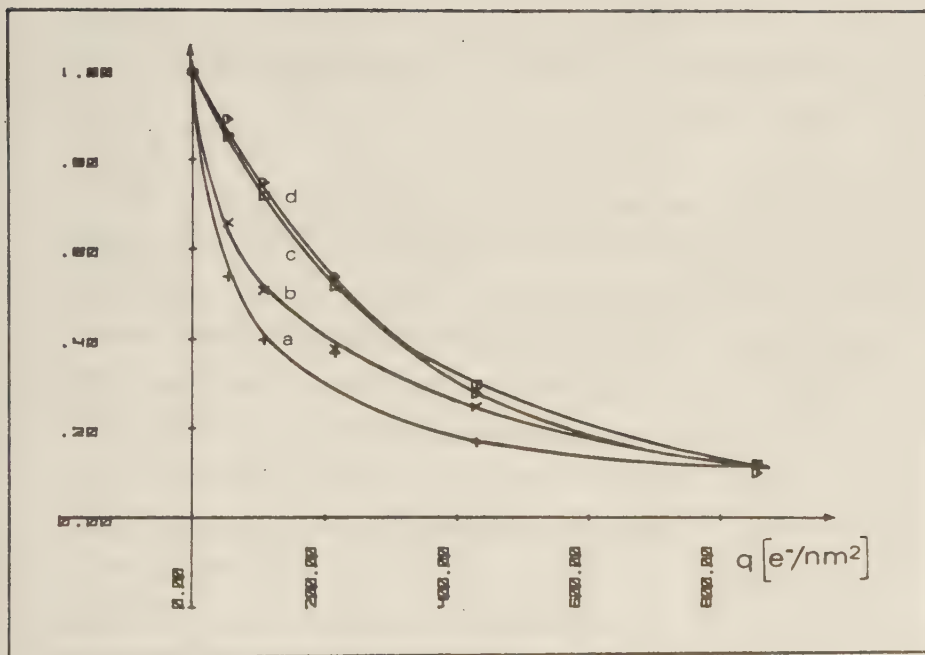


Abb. 30 Relative Abnahme der Intensität der α -Helix-Bande für a: Myoglobin, b: Haemoglobin in der Amid II-Region und der β -Struktur-Bande für c: β -Lactoglobulin, d: Concanavalin-A in der Amid I-Region

valin-A ist in Abb. 30 wiedergegeben. Die Lage dieser Bande war nicht fixiert und es ergab sich eine von der Dosisstufe abhängige Verschiebung dieser Bande zu höheren Wellenzahlen hin, die bereits bei Poly- γ -methyl-L-glutamat beobachtet wurde. Die Erklärung dafür, daß die β -Struktur-Bande von Chymotrypsin oberhalb von $214 \text{ e}^-/nm^2$ nicht mehr separierbar war trotz vorhandener Intensität, ist, daß ihre Lage mit 1642.5 cm^{-1} zu nahe an die bei 1655 cm^{-1} fixierte Lage der α -Helix/Random-coil-Bande heranrückt und nicht mehr aufgelöst werden kann.

α -Helix/Random coil und nicht wasserstoffgebundene C=O-Bande (Amid I)

Eine Separierung der α -Helix und Random coil-Banden konnte bei den Proteinen ebenso wie bei den zuvor untersuchten Homopolypeptiden nicht erreicht werden. Um ein aussagefähiges Ergebnis zu erhalten, mußte aus einer Reihe von Bandenformanalysen, die mit unterschiedlichen, vorgegebenen Werten für die Lage der α -Helix/Random coil- ($\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$) und nicht wasserstoffgebundenen C=O-Bande ($\sim 1685 \text{ cm}^{-1}$) durchgeführt wurden, ein Mittelwert für die Lage dieser Banden ermittelt werden. Die endgültige Bandenformanalyse wurde dann mit auf diese Werte fixierten Lagen der Banden durchgeführt (59). Die ermittelten mittleren Bandenlagen sind in den Tabellen V und VI für die α -Helix/Random coil- bzw. C=O-Bande angegeben. Die Tabellen V und VI geben auch das Verhalten der Absorptionsintensität der α -Helix/Random coil- bzw. der nicht assoziierten C=O-Bande in Abhängigkeit von der Dosis wieder.

α -Helix-Bande (Amid II)

Eine separate, der α -Helix zugeordnete Bande gelang es, bei der Bandenformanalyse der Amid II-Region von Hämoglobin und Myoglobin zu erhalten. Die Auflösung dieser

Tabelle V

$\left[\frac{q}{e^-/\text{nm}^2} \right]$	lineo.		lyso.		β -Lacto.		Conc.-A		Chyluo.		Tryp.-Inh.*		Lyso.	
	$\Delta x_{1/2}$	F_{1655}	$\Delta x_{1/2}$	F_{1657}	$\Delta x_{1/2}$	F_{1659}	$\Delta x_{1/2}$	F_{1663}	$\Delta x_{1/2}$	F_{1655}	$\Delta x_{1/2}$	F_{1655}	$\Delta x_{1/2}$	F_{1655}
0	45.9	1(95)	40.9	1(96)	44.0	1(57)	38.8	1(42)	41.1	1(47)	44.9	1(84)	39.6	1(77)
53	46.1	0.93	44.4	0.97	47.3	1.10	42.0	1.09	42.1	1.04	45.9	0.97	39.9	0.96
107	47.7	0.95	45.4	0.91	49.8	1.19	45.9	1.28	42.8	1.11	46.2	0.94	40.4	0.91
214	47.5	0.84	46.2	0.87	52.5	1.31	50.2	1.50	43.8	1.14	47.2	0.90	41.7	0.80
428	51.1	0.82	49.8	0.75	54.7	1.37	55.3	1.80	46.7	1.30	48.1	0.81	44.2	0.86
856	50.1	0.60	0.60	0.59	56.2	1.33	60.4	1.93	45.7	1.02	51.3	0.75	50.0	0.90
1712	56.7	0.45	57.4	0.46	67.5	1.01	67.0	1.67	48.3	0.69	58.1	0.72	54.9	0.81
2568	58.8	0.44	58.2	0.46	68.7	0.81	71.7	1.36	54.6	0.57	61.5	0.67	55.8	0.59

Verhalten der α -Helix/Random-coil -Bande ($\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$) in Abhängigkeit von der Dosis q . $\Delta x_{1/2}$: Halbwertsbreite der Bande in cm^{-1} ; F_v : relative Bandenfläche bezogen auf die Bandenfläche bei $q = 0 \left[\frac{e^-/\text{nm}^2}{} \right]$ (In Klammern: Flächenanteil der Bande bei $q = 0 \left[\frac{e^-/\text{nm}^2}{} \right]$ an der Amid I-Bande in Prozent; v : fixierte Lage der Bande (* : bei Trypsin-Inhibitor ist Lage der Bande fixiert).

Tabelle VI

$\frac{Q}{[e^-/nm^2]}$	Haem. 1682.0 cm^{-1}	Lyo. 1682.0 cm^{-1}	β -Lacto. 1684.0 cm^{-1}	Chymo. 1680.0 cm^{-1}	Tryps.-Inh. 1680.0 cm^{-1}	Lys. 1682.5 cm^{-1}
0	1 (5)	1 (4)	1 (10)	1 (26)	1 (11)	1 (13)
53	1.00	1.82	1.00	1.21	1.17	1.28
107	1.82	3.19	1.07	1.20	1.40	1.40
214	3.23	5.37	1.13	1.43	1.67	1.56
428	2.93	6.55	1.40	1.44	2.06	1.73
856	6.43	8.89	1.70	1.73	2.30	1.75
1712	9.16	10.76	2.77	1.93	2.13	1.86
2568	10.40	14.87	3.28	2.08	2.05	2.47

Relative Zunahme der nicht wasserstoffgebundenen C=O -Bande ($\sim 1686. cm^{-1}$) bei der Bestrahlung. Der Wert in Klammern bei Dosis $\Delta = O[e^-/nm^2]$ gibt den Anteil dieser Bande an der Gesamtfläche der Amid I - Bande in Prozent an.

Bande konnte bei den obigen Proteinen wegen des Fehlens von β -Strukturanteilen realisiert werden. Bei Proteinen mit β -Struktur ist nämlich die α -Helix-Bande ($\sim 1540 \text{ cm}^{-1}$) erstens zu wenig intensiv und zweitens zu nahe an einer schwachen Bande ($\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$), die der β -Struktur zugeordnet wird (53). Daß es sich bei der $\sim 1540 \text{ cm}^{-1}$ -Bande eindeutig um eine durch die α -helikale Konformation hervorgerufene Absorption handelt, wird zunächst durch die Differenzspektren in Abb. 6 - 12 bestätigt. Bei der Betrachtung der Differenzspektren fällt die Differenzbande bei $\sim 1540 \text{ cm}^{-1}$ auf, die sich bei Haemoglobin, Myoglobin, Lysozym und noch schwach bei Trypsin-Inhibitor schon bei der Dosisstufe von $53 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ ausbildet, bei den Proteinen mit überwiegend β -Struktur aber praktisch nicht vorhanden ist.

Die Auflösung der Amid II-Region wurde wie bei der Amid I-Region in der Weise durchgeführt, daß aus einer Reihe von Testbandenformanalysen ein Mittelwert für die Lagen aller drei zu separierenden Banden ($\sim 1545 \text{ cm}^{-1}$: α -Helix; $\sim 1530 \text{ cm}^{-1}$: β -Struktur/Random-coil; $\sim 1515 \text{ cm}^{-1}$: α -Helix/Seitenkettenschwingungen) ermittelt und in einer abschließenden Bandenformanalyse festgehalten wurden.

Das Verhalten der α -Helix-Bande bei Haemoglobin und Myoglobin ist in Tabelle IV wiedergegeben und in Abb. 30 graphisch dargestellt.

Diskussion

In der Abb. 30 ist die relative Abnahme der Absorptionsintensität der α -Helix-Bande des Haemogloblins (b) und Myoglobins (a) im Vergleich zu der Abnahme der β -Struktur-Bande des β -Lactoglobulins (c) und Concanavalin-A (d) dargestellt. Die dazu entsprechenden Daten sind in der Tabelle IV zusammengefaßt. Es ist ersichtlich, daß die α -helikale Struktur insbesondere im unteren Dosisbereich bis etwa $q = 200 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ erheblich empfindlicher als die β -Struktur ist. Während die Intensität der β -Struktur-Bande bei $q = 100 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ immer noch ca. 75 % ihres ursprünglichen Wertes aufweist, ist die Intensität der α -Helix-Bande des Myoglobins auf ca. 40 % und die des Haemoglobins auf ca. 50 % des ursprünglichen Wertes gesunken. Eine weitere Aussage, die die gewonnenen Daten liefern, ist, daß oberhalb der Dosis $q = 800 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ praktisch keine Sekundärstruktur* mehr vorhanden ist. Die Intensität der Banden beträgt nur noch 10 % des ursprünglichen Wertes.

In Abb. 31 ist das Verhalten der nicht wasserstoffgebundenen C=O-Bande wiedergegeben (siehe Tabelle VI). Die relative Zunahme dieser Bande, d.h. Verhältnis der Bandenfläche bei Dosis $q > 0$ zur Bandenfläche bei Dosis $q = 0$ ist für die Proteine, die überwiegend β -Struktur enthalten, in diesem Fall β -Lactoglobulin (c) und

* genauer: α -helikale oder β -Struktur, da es sich auch bei ungeordneter Struktur (Random-coil) um Sekundärstruktur handelt

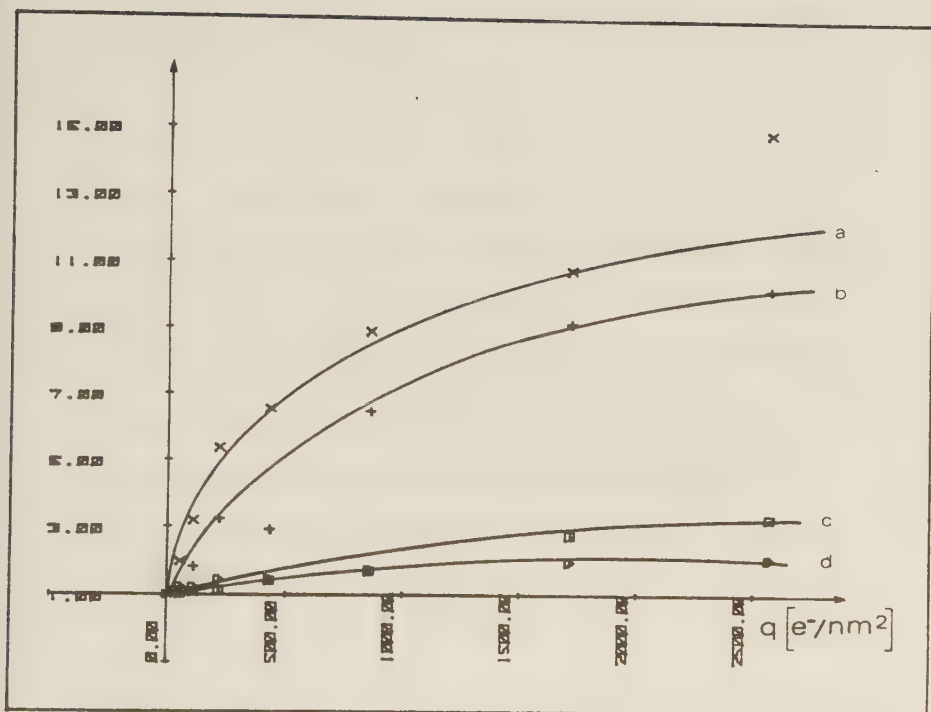


Abb. 31 Relative Zunahme der nichtwasserstoffgebundenen (nichtassoziierten) C=O-Bande ($\sim 1680 \text{ cm}^{-1}$)

Chymotrypsin (d) zu gering; denn während bei den α -helikalen Proteinen Haemoglobin (b) und Myoglobin (a) die Fläche der C=O-Bande bei der Dosis $q = 0$ sehr gering ist (siehe graphische Wiedergaben der Bandenformanalysen Abb. 23 - 29) kommt in der unmittelbaren Nachbarschaft ($\sim 1685 \text{ cm}^{-1}$) dieser Bande bei den Proteinen mit β -Struk-

tur eine zusätzliche Bande vor, die durch Absorption der antiparallelen β -Struktur verursacht wird. Es wird somit bei den zuletzt erwähnten Proteinen auf eine zu große Bandenfläche bei $q = 0 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ bezogen. Die Betrachtung der Bandenformanalysen in den Abb. 23 - 29, insbesondere der Ergebnisse bei hohen Dosisstufen, führt zu dem Schluß, daß die Zunahme der nicht wasserstoffgebundenen C=O-Bande bei Haemoglobin und Myoglobin, also bei den Proteinen mit hohem α -Helix-Gehalt, zwar besonders stark ist; aber da die Zunahme dieser Bande auch bei Chymotrypsin vergleichbar hoch ist, kann hier nicht auf einen besonderen Strahlenschadensmechanismus α -Helix-haltiger Proteine somit der α -Helix im Vergleich zu β -Struktur geschlossen werden.

Ein deutlicher Unterschied im Verhalten der β -Struktur enthaltenden Proteine Concanavalin-A, β -Lactoglobulin und Chymotrypsin und den übrigen untersuchten Proteinen bei Bestrahlung ergibt sich bei der Betrachtung der α -Helix/Random coil-Bande der Amid I-Region. Während diese Bande bei den α -Helix-Proteinen und denen mit gemischter Sekundärstruktur sofort bei Bestrahlungsbeginn abnimmt, wird sie bei den β -Struktur-Proteinen zunächst größer, um erst ab der Dosisstufe $q = 856 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ abzunehmen. Es findet somit bei diesen Proteinen zunächst ein Übergang von β -Struktur in Random coil oder α -Helix statt. Dafür, daß zumindest teilweise ein Übergang in

α -Helix-Konformation stattfindet, sprechen die folgenden beiden Beobachtungen:

- 1) Wird bei den β -Struktur-Proteinen die α -Helix/Random coil-Bande während der Bandenformanalyse in ihrer Lage nicht fixiert, so findet eine Verschiebung dieser Bande in Richtung niedrigerer Wellenzahlen, also in Richtung der Lage der α -Helix-Bande statt;
- 2) in den Differenzspektren von Chymotrypsin, dessen Sekundärstruktur immerhin zu 10 % aus α -Helix besteht, erscheint im Amid II-Bereich bei niedrigen Dosisstufen keine zu α -Helix gehörende Bande; der Anteil der durch Bestrahlung zerstörten α -helikalen Struktur könnte in diesem Fall durch α -Helices, die sich aus β -Struktur gebildet haben, ersetzt worden sein.

Computer-Simulationen von Bestrahlungen von Proteinsequenzen mit anschließender Sekundärstruktur-Voraussage nach (14), die wir durchgeführt haben (58), weisen ebenfalls auf eine mögliche Transformation der β -Struktur in α -Helix hin.

Wasserstoff-Deuterium-Austausch bestrahlter Proteine

Die Methode des Wasserstoff-Deuterium-Austauschs bietet die Möglichkeiten, Aussagen über die Tertiärstruktur von Proteinmolekülen zu gewinnen (51). Für unsere Untersuchungen ist die Beobachtung von Bedeutung, daß native Proteine ihre sogenannten labilen Wasserstoffatome (solche, die an Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel gebunden sind) zumindest an einigen ihrer Peptidgruppen wesentlich langsamer austauschen als das bei einfachen oder ungeordnet gefalteten Polypeptiden der Fall ist (34). Der langsame Verlauf des Wasserstoff-Deuterium-Austauschs in einem Protein, verglichen mit der Austauschrate, die man bei einfachen Peptiden findet, hat somit engen Bezug zur Konformation des Proteins, d.h. zu dessen Sekundär- und Tertiärstruktur. Ferner umfaßt der H→D-Austausch das gesamte Proteinmolekül, da dieses überall die reaktiven Gruppen, nämlich die Peptidgruppen besitzt. Daß durch den H→D-Austausch an sich eine Beeinflussung der Konformation stattfinden könnte, kann ausgeschlossen werden, da die Deuteriumatome den gleichen Raum im Molekül beanspruchen und auch sonst ähnliche Eigenschaften wie der ausgetauschte Wasserstoff haben. Da die Geschwindigkeit des H→D-Austausches stark von der Zugänglichkeit der an den Peptidbindungen beteiligten Wasserstoffatome abhängt, muß sich ein Auffalten des Proteinmoleküls als

Folge von Strahlenschäden (Zerstörung von Wasserstoffbrücken z.B.) in einer Beschleunigung der Austauschkinetik manifestieren. Als Austauschkinetik wird hier die relative Abnahme der Amid II-Bande in Abhängigkeit von der Deuterierungszeit bezeichnet.

In Abb. 32 sind die Infrarotspektren der Deuterierungen der unbestrahlten Proteine Myoglobin und Concanavalin-A im Bereich von 4000 bis 1350 cm^{-1} für verschiedene Deuterierungszeiten übereinander aufgetragen. Die Pfeile zeigen jeweils in Richtung der Zunahme oder Abnahme der entsprechenden Banden hin. Die wesentlichen Veränderungen der Spektren bei der Deuterierung äußern sich in der Abnahme der Amid II-Bande ($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$) und dem Anwachsen einer Bande bei $\sim 1450\text{ cm}^{-1}$ (deuterte Amid II-Bande).

Im Amid I-Bereich zeigen die Spektren ein deutlich unterschiedliches Verhalten der beiden untersuchten Proteine bei der Deuterierung. Dieser Unterschied tritt noch stärker hervor in den in Abbildungen 33 A und 34 A dargestellten Spektrenausschnitten. Während in 33 A die Amid I-Bande des Myoglobins um über 10 Wellenzahlen zu niedrigeren Wellenzahlen hin sich verschiebt, tritt an der Amid I-Bande des Concanavalin-A eine nur schwache Änderung im Bereich um 1685 cm^{-1} , der der Absorptionsbande der antiparallelen β -Struktur zuzu-

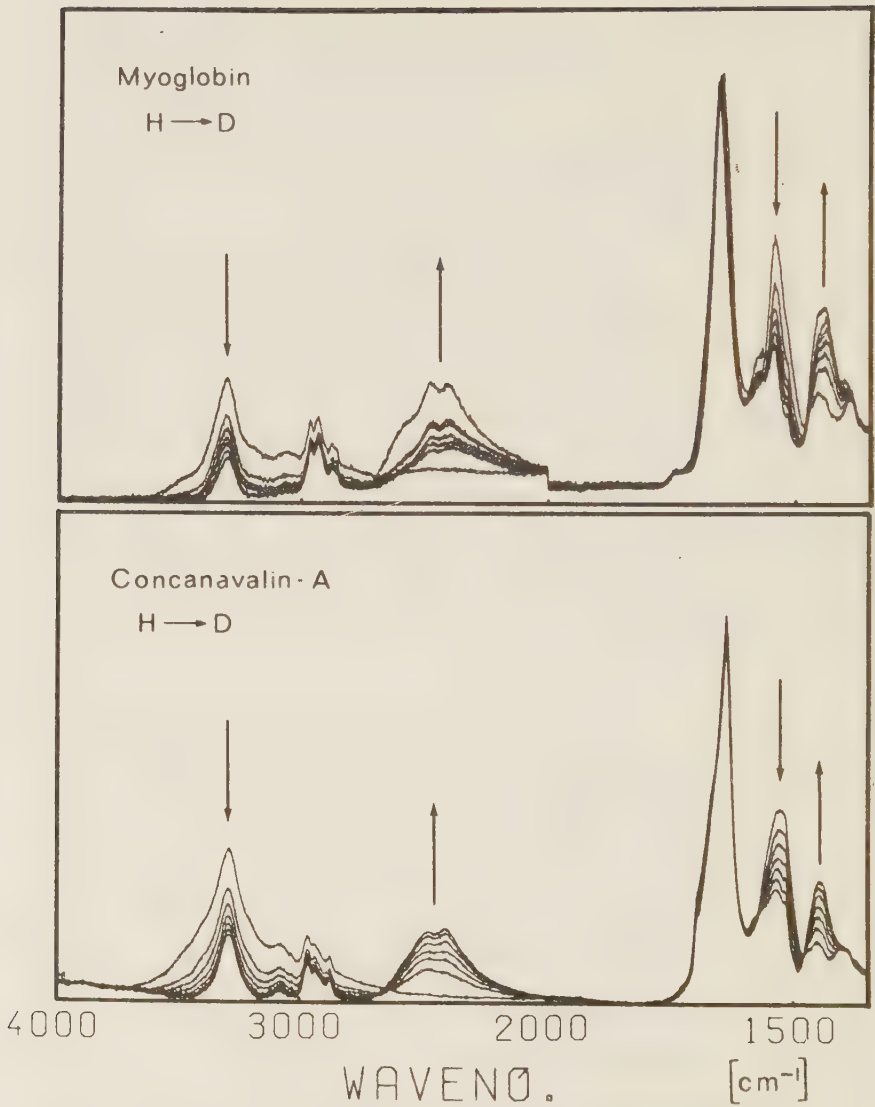


Abb. 32 Infrarotspektren der Deuterierungsreihen unbestrahlter Proteine

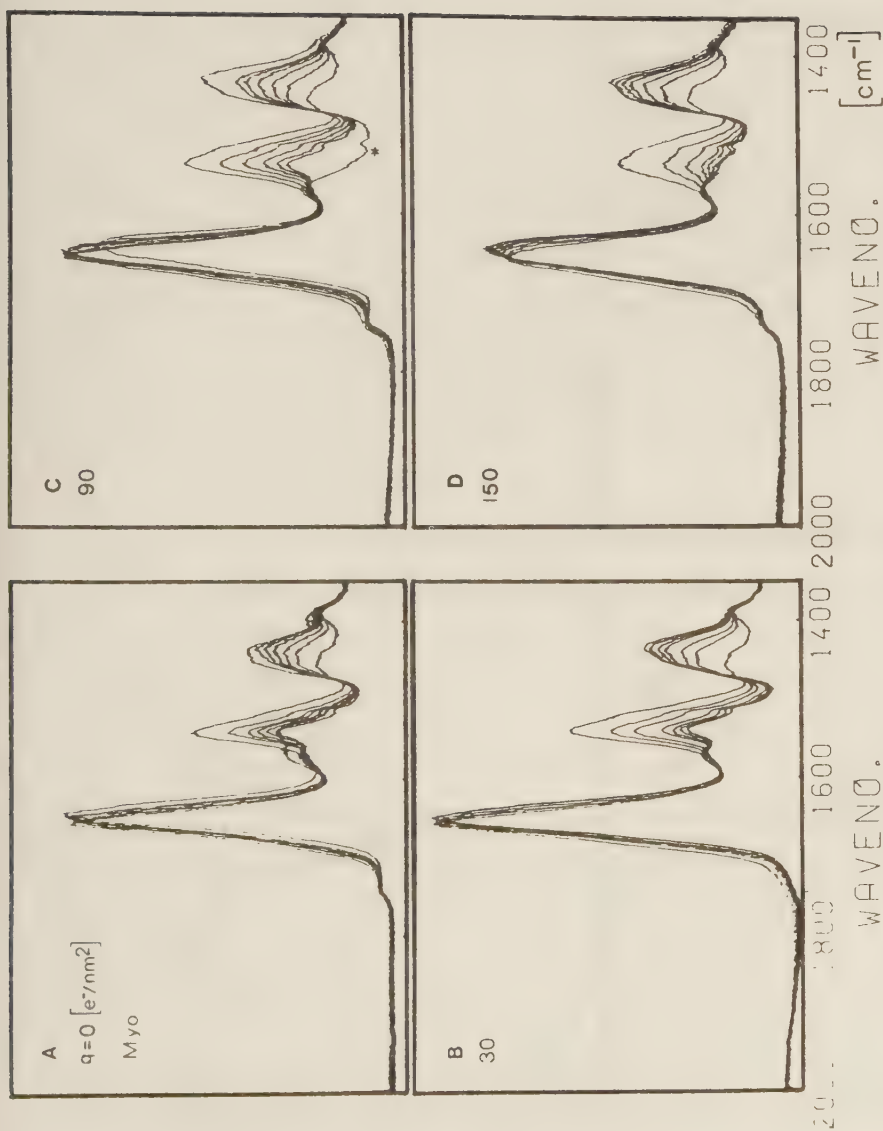


Abb.33 Deuterierungsspektren für unterschiedliche Bestrahlungen bei Myoglobin

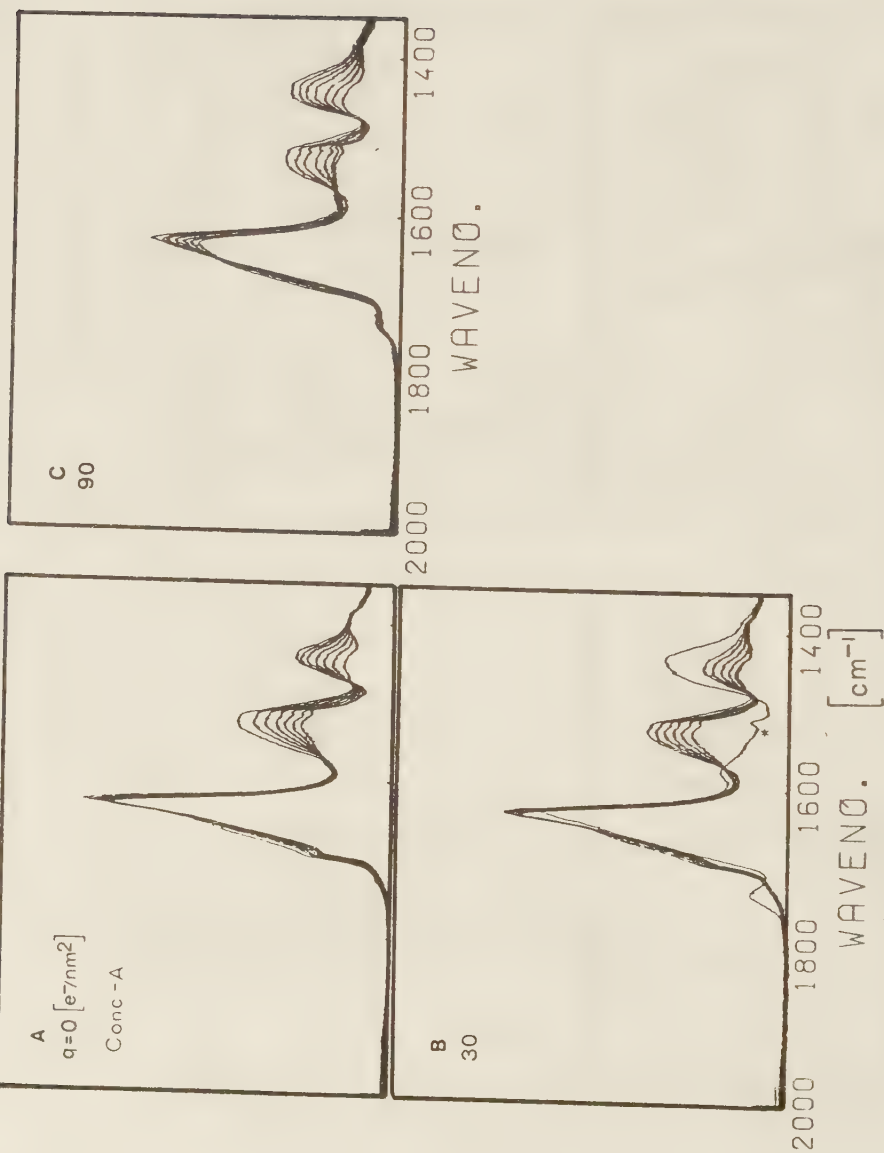


Abb. 34 Deuterierungsspektren für unterschiedliche Bestrahlungen bei Concanavalin-A

rechnen ist, auf. Dieser Unterschied in den Amid I-Banden läßt auf eine wesentlich "geschlosseneren" Tertiärstruktur beim Concanavalin-A schließen.

In den Abbildungen 33A - D und 34A - C sind die Deuterierungsinfrarotspektren für verschiedene Dosisstufen dargestellt. Die mit * bezeichneten Spektren in 33C und 34B sind in der Weise entstanden, daß D₂O-Tropfen in die Austauschküvette mit der ATR-Probenplatte eingedrungen waren (jeweils bei der letzten Deuterierungsstufe von 10800 s Dauer); dies hatte einen deutlich stärkeren H→D-Austausch zur Folge.

Bereits eine rein qualitative Betrachtung der zu Myoglobin und zu Concanavalin-A gehörenden Spektren läßt erkennen, daß sich die untersuchten Proteine bei Deuterierung sowohl unbestrahlt als auch nach erfolgter Bestrahlung deutlich unterschiedlich verhalten. Anhand der in den Abbildungen 35 und 36 dargestellten Kinetiken kann zunächst gefolgert werden, daß beim Myoglobinkomplex ein bedeutend schnellerer H→D-Austausch zu Beginn der Deuterierung stattfindet als bei Concanavalin-A.

Die für unsere Untersuchungen wesentliche Beobachtung ist, daß beide Moleküle bereits bei der sehr niedrigen Strahlendosis von $90 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ sich aufzufalten, also ihre Tertiärstruktur zu verändern beginnen. Während beim Myoglobin

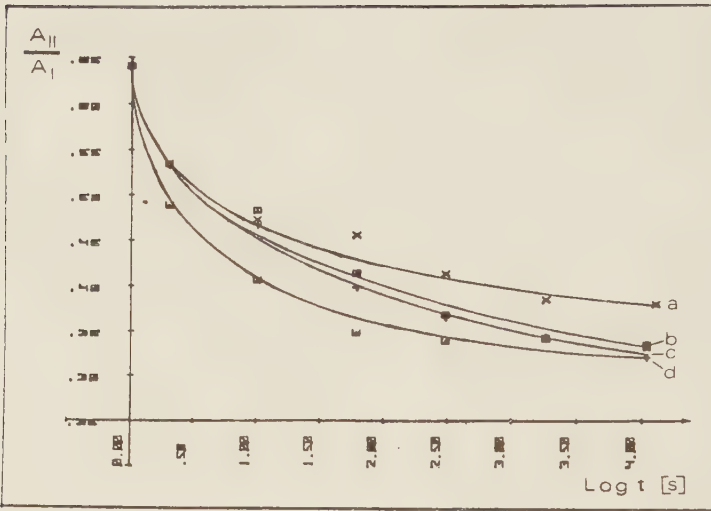


Abb. 35 Deuterierungskinetiken des Myoglobin.
a: $q = 0$, b: $q = 30$, c: $q = 90$, d: $q = 150$
jeweils e^-/nm^2

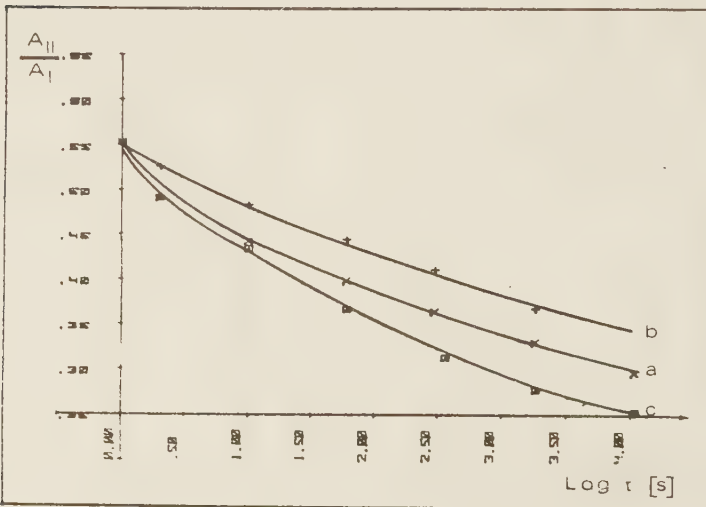


Abb. 36 Deuterierungskinetiken des Concanavalin-A.
a: $q = 0$, b: $q = 30$, c: $q = 90$ jeweils e^-/nm^2

sofort nach der Bestrahlung mit $q = 30 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ eine schnellere Austauschkinetik auftritt, d.h. das Molekül sich bereits bei dieser Dosis aufzufalten begonnen hatte (Kurve b in Abb. 35), verlangsamt sich die Austauschkinetik bei Concanavalin-A nach Bestrahlung mit der gleichen Dosis, um erst nach der Bestrahlung mit $q = 90 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ einen schnelleren Verlauf zu nehmen als in unbestrahltem Zustand (Kurve c in Abb. 36).

Die bei der Dosis $q = 30 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ eintretende Verlangsamung der Austauschkinetik bei Concanavalin-A kann nur in der Weise gedeutet werden, daß bei niedrigen Elektronendosen die Tertiärstruktur dieses Moleküls erhalten bleibt, während durch Massenverlust die am unbestrahlten Molekül außen liegenden und für $\text{H} \rightarrow \text{D}$ -Austausch zugänglichen Wasserstoffatome verlorengehen, mit der Folge, daß sich die Austauschkinetik verlangsamt. Eine Rolle spielt auch die Hydrophobisierung der Moleküloberfläche (Seitenketten von hydrophoben Residuen sind besonders resistent gegen Bestrahlung; solche von hydrophilen Residuen wiederum werden bei Bestrahlung in Alanin, Glycin und α -Amino-Buttersäure, die ebenfalls hydrophob sind, transformiert (7)). Eine hydrophobe Moleküloberfläche verhindert, solange das Molekül gefaltet bleibt, das Eindringen des D_2O -Dampfes ins Innere.

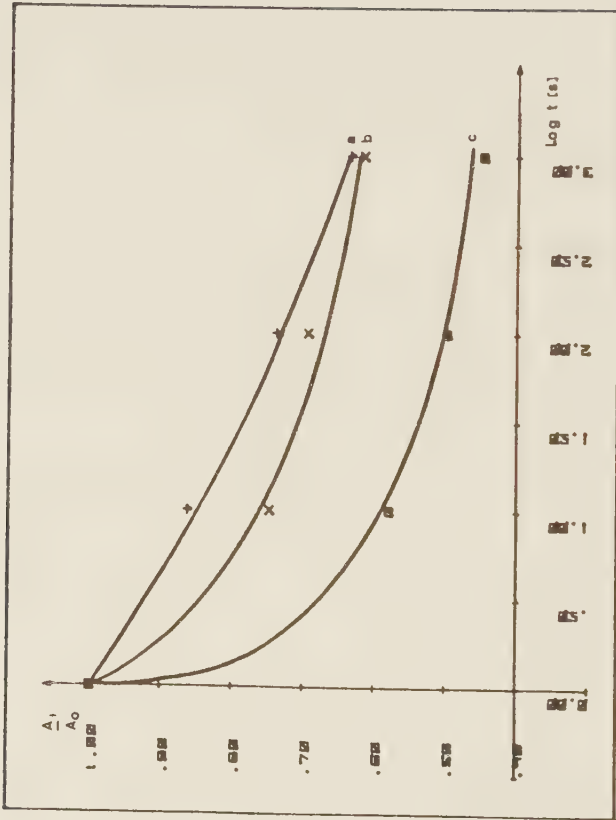


Abb. 37 Deuterierungskinetiken des Chymotrypsin (hier: relative Abnahme der Amplitude der Amid II-Bande als Funktion der Deuterierungszeit t)
a: $q = 0$, b: $q = 30$, c: $q = 90 \text{ e}^-/\text{nm}^2$

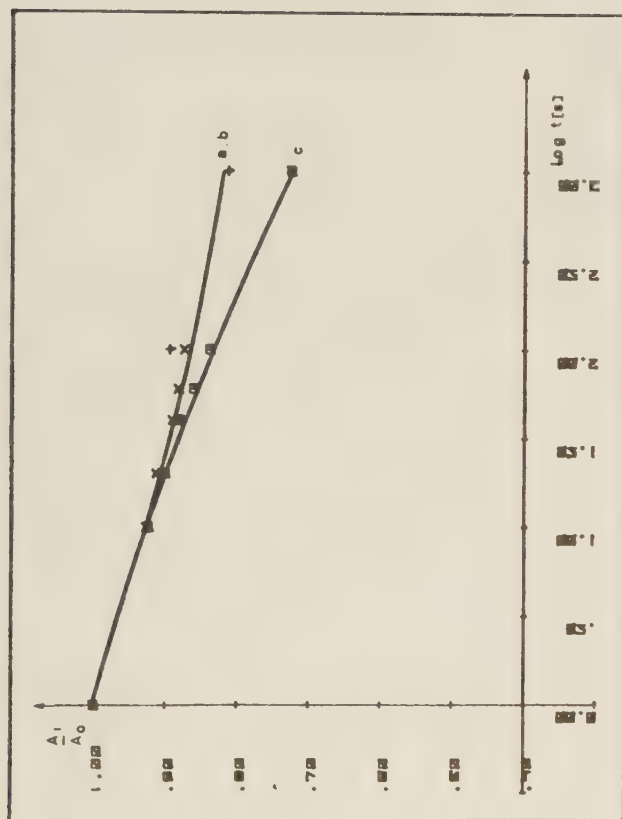


Abb. 38 Deuterierungskinetiken des β -Lactoglobulins (hier: relative Abnahme der Amplitude der Amid II-Bande als Funktion der Deuterierungszeit t)
a: $q = 0$, b: $q = 30$, c: $q = 90 \text{ e}^-/\text{nm}^2$

Daß die höhere Resistenz der Tertiärstruktur des Concanavalin-A nicht durch dessen Sekundärstruktur (den hohen β -Strukturanteil) bedingt ist, ergab die Bestrahlung und Aufnahme der $H \rightarrow D$ -Austauschkinetiken des Chymotrypsin (Abb. 37), das ebenfalls zu der Gruppe der β -Struktur-Proteine gehört. Der $H \rightarrow D$ -Austausch beim Chymotrypsin wird ebenso wie beim Myoglobin sofort nach der Bestrahlung mit $q = 30 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ schneller (Kurve a: $q = 0$, b: $q = 30$, c: $q = 90 \text{ e}^-/\text{nm}^2$).

β -Lactoglobulin, das wir ebenfalls untersucht haben und das auch zu der Gruppe der Proteine mit hohem β -Strukturanteil gezählt wird, zeigt ähnliche $H \rightarrow D$ -Austauschkinetiken als Folge der Bestrahlung wie Concanavalin-A. In der Abb. 38 geben die Kurven a und b, die übereinander liegen, die $H \rightarrow D$ -Austauschkinetiken für unbestrahltes bzw. für mit $q = 30 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ bestrahltes β -Lactoglobulin wieder. Erst nach der Bestrahlung mit $q = 90 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ ergibt sich ein schnellerer $H \rightarrow D$ -Austausch.

E. Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß der Bestrahlung von Homopolypeptiden und globulären Proteinen mit 100 kV Elektronen auf deren Sekundärstruktur quantitativ untersucht. Die Bestrahlungen erfolgten unter Bedingungen, wie sie beim Betrachten von molekularen Objekten im Elektronenmikroskop vorliegen. Die quantitativen Aussagen lieferte rechnerunterstützte ATR-Infrarotspektroskopie. Die Untersuchungen bezogen sich hauptsächlich auf die Amid I- und Amid II-Banden der gewonnenen IR-Spektren.

Die Abnahme der Gesamtabsorptionsintensität der Amid I- und Amid II-Banden in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis konnte nach unseren Beobachtungen in zwei Bereiche eingeteilt werden. Im unteren Dosisbereich bis $500 \text{ e}^-/\text{nm}^2$, in dem die Feinstruktur der Banden abnahm, ist der Intensitätsverlust hauptsächlich durch das Aufbrechen von N-H-Bindungen bedingt. Oberhalb $500 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ gibt die Intensitätsabnahme den Massenverlust der bestrahlten Materialien wieder.

Ausgangspunkt für die Untersuchung der bestrahlungsbedingten Veränderungen der Sekundärstruktur waren die Homopolypeptide Poly- γ -methyl-L-glutamat und Poly- γ -benzyl-L-glutamat.

Bei diesen Polypeptiden ließen sich je nach verwendetem Lösungsmittel unterschiedliche Sekundärstrukturen erzeugen. Zusätzlich konnte das dichroitische Verhalten der Homopolypeptidmonolayer untersucht werden, da die Schichten mit Langmuir Blodgett-Technik geordnet auf die ATR-Platten aufgebracht wurden.

Die Bandenformanalyse, d.h. die Separierung der zu bestimmten Konformationen zugehörigen Einzelbanden der Amid I-Region der bestrahlten Homopolypeptide lieferte folgende für die Bandenformanalyse von Proteinspektren wichtige Ergebnisse:

- a) Die Banden werden optimal mit Cauchy-Funktionen angenähert
- b) Die Halbwertsbreiten der zu den hochgeordneten Sekundärstrukturen (α -Helix und β -Struktur) zugehörigen Banden ändern sich während der Bestrahlung nicht.

Mit der Bestimmung des dichroitischen Verhältnisses in Abhängigkeit von der Strahlendosis konnte die Strahlenschutzwirkung des Benzylsubstituenten bei Polybenzylglutamat nachgewiesen werden. Damit erwies sich die obige Methode als ein geeignetes Verfahren zum Testen von Strahlenschutzmaßnahmen für elektronenmikroskopische Objekte.

Die von uns untersuchten Proteine waren: Haemoglobin und Myoglobin, die hauptsächlich α -helikale Sekundärstruktur enthalten, Concanavalin-A, β -Lactoglobulin und Chymotrypsin,

die überwiegend β -Struktur-haltig sind und Lysozym und Trypsin-Inhibitor, die sowohl α -Helix als auch β -Struktur enthalten. Mit der Bandenformanalyse gelang es bei den α -Helix-haltigen Proteinen in der Amid II-Region der Spektren der Bestrahlungsreihen eindeutig die zur α -Helix-Konformation zugehörige Absorptionsbande aufzulösen, während in der Amid I-Region der Spektren der β -Struktur-haltigen Proteine die zur β -Struktur zugehörige Absorptionsbande separiert werden konnte. Das Verhalten dieser Banden in Abhängigkeit von der Dosis lieferte die Aussage, daß erstens im unteren Dosisbereich bis ca. $200 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ die α -helikale Struktur bedeutend empfindlicher gegenüber Bestrahlung als die β -Struktur ist und zweitens, daß oberhalb $800 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ bei den untersuchten Proteinen praktisch keine der hochgeordneten Sekundärstrukturen wie α -Helix und β -Struktur mehr vorhanden sind.

Es wurde weiterhin auch eine starke Intensitätszunahme der zur nichtassozierten Carbonylbindung zugehörigen Absorptionsbande bei $\sim 1685 \text{ cm}^{-1}$ als Folge der Bestrahlung beobachtet.

Aussagen über Änderungen der Tertiärstruktur infolge der Bestrahlungen lieferte die Untersuchung des Wasserstoff-Deuterium-Austauschs. Die deutliche Zunahme der Austauschgeschwindigkeit ab einer Dosisstufe von $90 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ beweist, daß eine Auffaltung der Moleküle bereits bei dieser geringen Elektronendosis stattfindet.

Literaturverzeichnis

1. Alexander, P. and A. Charlesby, Nature 173, 587 (1954)
2. Alexander, P., L. D. G. Hamilton and K. A. Stacey,
Nature 184, 226-228 (1959)
3. Bahr, G. F., E. Zeitler and F. B. Johnson, Quantitative
Electron Microscopy (Bahr & Zeitler, eds.) Vol. 14,
4. Baumeister, W. and M. H. Hahn, Nature 241, 445-447 (1973)
5. Baumeister, W., U. P. Fringeli, M. Hahn, F. Kopp and
J. Seredynski, Biophys. J. 16, 791-810 (1976)
6. Baumeister, W. and M. Hahn, Prospects for atomic resolution
electron microscopy in membranology. In: Danielli, J. F.
and Cadenhead (eds.): Progress in Surface and
Membrane Science, Vol. 11, 227-339, Academic Press,
New York 1976
7. Baumeister, W., M. Hahn, J. Seredynski and L. M. Herbertz,
Ultramicroscopy 1, 377-382 (1976)
8. Baumeister, W., U. P. Fringeli and M. Hahn, Proc. Europ.
Congr. Electr. Micr., pp. 507-509, Jerusalem 1976
9. Baumeister, W., Cytobiologie 17, 246-297 (1978)
10. Baumeister, W. and O. Kübler, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75,
5525-5528 (1978)

11. Bellamy, L.J., Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution, Dr.Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt 1966
12. Blodgett, K.B., J.Amer.Chem.Soc. 57, 1007, (1935)
13. Blout, E.P., C.de Lozé and A.Asadourian, J.Am.Chem.Soc. 81, 62 (1961)
14. Chou, P.Y. and G.D.Fasman, Biochemistry 13, 222-245 (1974)
15. Crewe, A.V., Ber.Bunsenges.phys.Chem. 74, 1171-1174 (1970)
16. Drescher, H., E.R.Krefting, L.Reimer und H.Seidel, Z.Naturforsch., Teil A, 29, 833-837 (1974)
17. Engel, A., Ultramicroscopy 3, 273-281 (1978)
18. Fahrenfort, J., Spectrochim.Acta 17, 698 (1961)
19. Formanek, H., M.Müller, M.H.Hahn und T.Koller, Naturwiss. 58, 339-344 (1971)
20. Frank, J. Vortrag beim EMBO Workshop, Gais, Switzerland 1973
21. Frank, J., Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy, p. 213 (J.K.Koehler, ed.) Springer, Berlin 1973
22. Fraser, R.D.B. and E.Suzuki, in: Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry, Part C (Sidney J. Leach, ed) AP New York & London 1973
23. Garfinkel, D. and J.T.Edsall, J.Amer.Chem.Soc. 80, 3807-3831 (1958)

24. Glaeser, R.M. and D.W. Deamer, Proc. 27. Ann. EMSA Meeting, 338-339, Baton Rouge 1969
25. Glaeser, R.M., In: Electron Microscopy and Microbeam Analysis (Siegel, B.M., ed.) John Wiley & Sons, New York 1974
26. Grubb, D.T., J. Mat. Sci. 2, 1715-1736 (1974)
27. Hahn, M., U.P. Fringeli and W. Baumeister, 8th Int. Congr. Electr. Mic., Vol. 2, 672, Canberra 1974
28. Hahn, M., J. Seredynski and W. Baumeister, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 823-827 (1976)
29. Hainfeld, J., M. Isaacson and M. Sogard, Proc. 34. Ann. EMSA Meeting, 30-31, Miami Beach 1976
30. Harrick, N.J., Internal Reflection Spectroscopy, Interscience, New York 1967
31. Hashimoto, H., A. Kumao, K. Hino, H. Endoh, H. Yotsumoto and A. Ono, J. Electron Micr. 22, 123-134 (1973)
32. Henkelmann, R.M., F.P. Ottensmeyer, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 3000-3004 (1971)
33. Hoppe, W., R. Langer, J. Frank und A. Feltynowski, Naturwissenschaften 56, 267 (1969)
34. Hvidt, A. and S.O. Nielsen, Adv. Protein Chem. 21, 287 (1966)
35. Isaacson, M., D. Johnson and A.V. Crewe, Rad. Res. 55, 205 (1973)

36. Isaacson, M.S., Radiation damage to biological specimens.
In: Principles and Techniques of Electron Microscopy:
Biological Applications, Vol. 7, (Hayat, M.A., ed.)
Van Nostrand Reinhold Company, New York and London 1976
37. Kanter, H., Ann. Phys. 20, 144-166 (1957)
38. Krohmer, P. und R. Duelli, Anwendungstechnisches Labor
Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co. GmbH, Überlingen,
35 UR (1967)
39. Kübler, O., M. Hahn and J. Seredynski, Proc. 6th Congr.
Electr. Micr. Vol. 1, 306-308, Jerusalem 1976
40. Kübler, O., M. Hahn and J. Seredynski, Optik 51, 171-188 (1978)
41. Kübler, O., M. Hahn and J. Seredynski, Optik 51, 235-256 (1978)
42. Kulenkampff, H. und W. Spyra, Z. Phys. 137, 416-425 (1954)
43. Langer, R., J. Frank, A. Feltynowski und W. Hoppe, Ber.
Bunsenges. Phys. Chem. 74, 1120 (1970)
44. Lenz, F., Z. Angew. Phys. 2, 337-340 (1950)
45. Lenz, F., Z. Naturforsch. 9a, 185-204 (1954)
46. Levitt, M. and J. Greer, J. Mol. Biol. 114, 181-293 (1978)
47. Loeb, G.I. and R.E. Baier, J. Coll. Interf. Sci. 27, (1968)
48. Miyazawa, T. and E.R. Blout, J. Am. Chem. Soc. 83, 712 (1960)
49. Miyazawa, T., Biological Macromolecules, Series 1,
(Fasman, G.D., ed.) Dekker, New York 1967

50. Ottensmeyer, F.P., E.E. Schmidt, T. Jack and J. Powell,
J. Ultrastruct. Res. 40, 546-555 (1972)
51. Parker, F.S., Applications of Infrared Spectroscopy
in Biochemistry, Biology and Medicine.
A. Hilger, London 1971
52. Reimer, L., Lab. Invest. 14, 939 (1965)
53. Schellman, J.A. and C. Schellman, The Proteins, Vol. 2, p. 1
2nd Ed. (Neurath, H., ed.) Academic Press, New York 19
54. Schram, B.L., F.J. De Heer, M.J. van der Wiel and
J. Kistemaker, Physica 31, 94-112 (1965)
55. Schram, B.L., M.J. van der Wiel, F.J. De Heer, and
H.R. Moustafa, J. Chem. Phys. 44, 49-54 (1966)
56. Schulte-Frohlinde, D., Ber. Bunsenges. 74, 1196 (1970)
57. Seiler, M., Beitr. Elektronenmikr. 1, 27-52 (1968)
58. Seredynski, J. and W. Baumeister, 18. Tg. Dtsch. Ges.
Elektronenmikr. Münster 1977
59. Seredynski, J., W. Baumeister and B. Klefffel, On the
quantitative interpretation of protein secondary
structure by computer aided IR-spectroscopy,
(in Vorbereitung)
60. Smith, P.R., Ultramicroscopy 3, 153-160 (1978)
61. Stenn, K. and G.F. Bahr, J. Histochem. Cytochem. 18,
574-580 (1970)

62. Stenn, K. and G.F. Bahr, J. Ultrastruct. Res. 31,
526-570 (1970)
63. Thach, R.E. and S.S. Thach, Biophys. J. 11, 204-210
(1971)
64. Unwin, P.N.T. and R. Henderson, J. Mol. Biol. 94, 425-440
(1975)
65. Vallance-Jones, A., Ph.D. thesis, Cambridge 1949
66. Zundel, G., Biophysik (W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl
und H. Ziegler, eds.) 103-108. Springer Verlag,
Berlin 1977

Danksagung

Herrn Professor Dr. Wolrad Vogell danke ich für die Übernahme des Referats und die großzügige Gewährung umfangreicher Arbeitsmöglichkeiten.

Herrn Professor Dr. Leonhard Birkofer danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Priv. Doz. Dr. Wolfgang Baumeister danke ich für sehr zahlreiche anregende Diskussionen, die dem Fortgang der vorliegenden Arbeit sehr förderlich waren.

Herrn Dr. Max Hahn danke ich für die Zusammenarbeit bei der Entwicklung der Elektronendosimetrie und für die Einweisung zur Durchführung der Bestrahlungen.

Herrn Lothar Schneider danke ich für die Ausfertigung graphischer Darstellungen sowie Fräulein Martha Türken und Fräulein Sabine Wenzel für die durchgeführten Photoarbeiten.

Frau Ingeburg Werner danke ich ganz besonders für die sorgfältige Maschinenschrift des Manuskripts.

Lebenslauf

Ich wurde am 3. Juli 1944 in Alt-Sandetz geboren.

Meine Eltern sind Anton Seredynski und seine Ehefrau Stanislawa geborene Mark. Meine Eltern sind beide Altphilologen.

1950: Einschulung an der Grundschule in Tiegenhof bei Danzig

1956: Übersiedlung aus Polen in die Bundesrepublik

1956-1958: Besuch einer Förderschule für Spätaussiedlerkinder in Mühlheim an der Möhne

1958-1965: Besuch des Gymnasiums in Wolfsburg

1965: Abitur

1965-1966: Wehrdienst

1966-1971: Studium der Physik an der Technischen Universität in Braunschweig

1971: Studienabschluß als Diplom Physiker

1971-1973: Beschäftigt als Wissenschaftlicher Angestellter an der Physikalisch Technischen Bundesanstalt in Braunschweig im Labor für Wissenschaftliche Photographie

ab 1973: Wissenschaftlicher Assistent an der Universität Düsseldorf, Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie

Es sind von mir bisher zum Teil in Zusammenarbeit mit anderen 17 Veröffentlichungen erschienen. Mit der Durchführung der vorliegenden Arbeit habe ich im Herbst 1977 begonnen.

Ich bin verheiratet und habe eine Tochter.

